

---

**Struktur und Funktion von S-Layern acidophiler  
Bakterien und Archaeen, ihre Rolle bei der Pyrit-  
Oxidation sowie die Adhäsion an Oberflächen**



**Dissertation**

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

vorgelegt von

**Andreas Klingl**

aus Deggendorf

Januar 2011



---

Diese Arbeit wurde angeleitet von Prof. Dr. Reinhard Rachel

Promotionsgesuch eingereicht am: 25.01.2011

Tag der mündlichen Prüfung: 23.02.2011

Prüfungsausschuss:	Vorsitzender	Prof. Dr. Ralph Witzgall
	1. Gutachter und Prüfer	Prof Dr. Reinhard Rachel
	2. Gutachter und Prüfer	Prof. Dr. Reinhard Wirth
	3. Prüfer	Prof. Dr. Reinhard Sterner
	Ersatzprüfer	Prof. Dr. Herbert Tschochner



---

Meinen Eltern  
in Liebe und Dankbarkeit

„Ein Tropfen Liebe ist mehr als ein Ozean Verstand“

Blaise Pascal



---

## Publikationsliste

- Etzel K., Klingl A., Huber H., Rachel R., Schmalz G., Thomm M. und Depmeier W. (2008) Etching of {111} and {210} synthetic pyrite surfaces by two archaeal strains, *Metallosphaera sedula* and *Sulfolobus metallicus*. *Hydrometallurgy* 94: 116-120.
- Veith A., Klingl A., Zolghadr B., Lauber K., Mentele R., Lottspeich F., Rachel R., Albers S.V. und Kletzin A. (2009) *Acidianus*, *Sulfolobus* and *Metallosphaera* Surface Layers: Structure, Composition and Gene Expression. *Molecular Microbiology* 73: 58-72.
- Zolghadr B., Klingl A., Koerdt A., Driessen A.J.M., Rachel R. und Albers S.-V. (2010) Appendage-Mediated Surface Adherence of *Sulfolobus solfataricus*. *Journal of Bacteriology* 192: 104-110.
- Loibl M., Grossmann G., Stradalova V., Klingl A., Rachel R., Tanner W., Malinsky J., und Opekarová M. (2010) C-terminus of Nce102 determines the structure and function of microdomains in the *Saccharomyces cerevisiae* plasma membrane. *Eukaryotic Cell* 9: 1184-1192.
- Rachel R., Meyer C., Klingl A., Gürster S., Heimerl T., Wasserburger N., Burghardt T., Kueper U., Bellack A., Schopf S., Wirth R., Huber H. und Wanner G. (2010) Analysis of the Ultrastructure of Archaea by Electron Microscopy. *Methods in Cell Biology* 96: 47-69.
- Zolghadr B., Klingl A., Rachel R., Driessen A.J.M., und Albers S.-V. (2011). The bindosome is a structural component of the *Sulfolobus solfataricus* cell envelope. *Extremophiles* 15.
- Klingl A., Moissl-Eichinger C., Wanner G., Zweck J., Huber H., Thomm M. und Rachel R. (2011) Analysis of the surface proteins of *Acidithiobacillus ferrooxidans* strain SP5/1 and the new, pyrite-oxidizing *Acidithiobacillus* isolate HV2/2, and their possible involvement in pyrite oxidation. *Archives of Microbiology*. *Submitted*.



# Inhaltsverzeichnis

<b>I</b>	<b>EINLEITUNG</b>	<b>1</b>
1	„ <i>Acid mine drainage</i> “ als Folge der biotischen Oxidation von Pyrit	1
2	Die Gattung <i>Acidithiobacillus</i>	7
3	<i>Surface layer</i> - Regelmäßig angeordnete 2D-Proteinkristalle	8
4	Der S-Layer der Sulfolobales – <i>Acidianus</i> , <i>Sulfolobus</i> und <i>Metallosphaera</i>	11
5	Adhäsion von Archaeen an anorganischen Oberflächen	12
6	Zielsetzung	13
<b>II</b>	<b>MATERIAL UND METHODEN</b>	<b>15</b>
<b>1</b>	<b>Substanzen und Bezugsquellen</b>	<b>15</b>
1.1	Chemikalien	15
1.2	Enzyme und kommerzielle Kits	17
1.3	Molekularmassenstandards	17
1.4	Antikörper	18
1.5	PCR-Primer	18
1.6	Verbrauchsmaterialien und Geräte	18
<b>2</b>	<b>Kulturmedien und Anzucht der Mikroorganismen</b>	<b>19</b>
2.1	Zusammensetzung der Medien	19
2.1.1	9k-Medium (Silverman und Lundgren, 1959)	19
2.1.2	MAL-Medium	20
2.1.3	M1-Medium	20
2.1.4	Allen-I-Medium	21
2.1.5	Brock-Medium	22
2.2	Herstellung der Kulturmedien	22
2.2.1	Labormaßstab – Serumflaschen und Erlenmeyerkolben	22
2.2.2	Großtechnische Anzucht im Fermenter	22
2.2.3	Bestimmung der optimalen Wachstumstemperatur und des pH-Wertes	22
2.2.4	Ermittlung des Substratspektrums	23
2.2.5	Anaerobes Wachstum und Stickstofffixierung	23
<b>3</b>	<b>Sterilisation</b>	<b>24</b>
<b>4</b>	<b>Verwendete Organismen und Inkubationsbedingungen</b>	<b>25</b>

## Inhaltsverzeichnis

---

4.1	Stämme	25
4.2	Inkubationsbedingungen	25
<b>5</b>	<b>Mikroskopie</b>	<b>26</b>
5.1	Phasenkontrast- und Fluoreszenzmikroskopie	26
5.1.1	Lichtmikroskopie	26
5.1.2	Bestimmung der Zellzahlen	26
5.1.3	Fluoreszenzfärbung mit DAPI	26
5.2	Transmissionselektronenmikroskopie	27
5.2.1	Herstellung von Suspensionspräparaten und Kontrastierung	27
5.2.2	Gefrierbruch und Gefrierätzung	27
5.2.3	Hochdruckgefrieren von Mikroorganismen	28
5.2.3.1	Hochdruckgefrieren	28
5.2.3.2	Gefriersubstitution	29
5.2.3.3	Infiltration und Einbettung in Epon <sup>®</sup> 812	30
5.2.3.4	Anfertigen von Ultradünnschnitten	31
5.2.3.5	Positiv-Kontrastierung von Ultradünnschnitten	32
5.2.4	Tomographie	32
5.2.5	EDX-Spektroskopie an Ultradünnschnitten (Reimer und Kohl, 2009)	33
5.2.6	Bildverarbeitung und Datenauswertung	33
5.3	Rasterelektronenmikroskopie	33
5.3.1	Gefriertrocknung – Standardmethode (Rachel <i>et al.</i> , 2010)	34
5.3.2	Gefriertrocknung – Hochdurchsatz-Methode	34
5.3.3	Entwässerung der Proben bei Raumtemperatur (Rachel <i>et al.</i> , 2010)	35
5.3.4	Schwermetall-Bedampfung	35
<b>6</b>	<b>Photometrische Bestimmung der Eisenkonzentration</b>	<b>36</b>
6.1	Reagenzien und Lösungen	36
6.2	Erstellung einer Eichkurve	36
6.3	Bestimmung der Eisenkonzentration in Kulturen	37
<b>7</b>	<b>Proteinbiochemie</b>	<b>37</b>
7.1	Zellaufschluss	37
7.2	S-Layer-Präparation	38
7.2.1	Puffer und Lösungen	38
7.2.2	Differentielle Zentrifugation und Lipidextraktion mit Detergenz	39
7.2.3	Chemische Deglykosylierung mit HF-Pyridin	39
7.3	Bestimmung der Proteinkonzentration	39
7.4	SDS Polyacrylamid Gelelektrophorese	40
7.4.1	Herstellung der Gele	40
7.4.2	Vorbereitung der Proben für die Gelelektrophorese	41
7.4.3	Gelelektrophorese – Bedingungen und Puffersystem	41

## Inhaltsverzeichnis

---

7.4.4	Gelfärbemethoden und Dokumentation	42
7.4.4.1	Coomassie-Färbung modifiziert nach Neuhoff <i>et al.</i> (1988)	42
7.4.4.2	Silber-Färbung nach Blum <i>et al.</i> (1987)	43
7.4.4.3	Periodat-Schiff-Färbung nach Segrest und Jackson (1972)	44
7.4.4.4	Alcianblau-Färbung (Cowman <i>et al.</i> , 1984; modifiziert nach Veith, 2006)	44
7.4.4.5	Dokumentation und Trocknung der Gele	45
7.5	Western Blot	45
7.5.1	Transfer der Proteine auf PVDF-Membranen	45
7.5.2	Immunologischer Nachweis von Proteinen	46
7.6	Identifizierung von Proteinen	47
7.6.1	N-terminale Sequenzierung	47
7.6.2	Massenspektrometrie tryptischer Peptide – MALDI MS/MS	47
7.6.3	Bioinformatische Auswertung der Peptid- und Proteinsequenzen	49
<b>8</b>	<b>Immunologische Lokalisation von Proteinen</b>	<b>50</b>
8.1	Generierung Protein-spezifischer Antikörper	50
8.2	Puffer und Lösungen	50
8.3	Immunmarkierung für die Elektronenmikroskopie	51
8.3.1	Freeze-fracture labeling nach Fujimoto (1995)	51
8.3.2	Immunmarkierung an Ultradünnschnitten – Immunogold labeling	52
<b>9</b>	<b>Molekulargenetische Methoden</b>	<b>53</b>
9.1	Isolierung von DNA	53
9.1.1	Puffer und Lösungen	53
9.1.2	DNA-Isolierung nach Tillett und Neilan (2000, mod.)	53
9.1.3	DNA-Isolierung mit Plasmid-Kit	53
9.2	Bestimmung der DNA-Konzentration	54
9.3	Agarose-Gelelektrophorese	54
9.3.1	Elektrophorese- und Probenpuffer	54
9.3.2	Gelelektrophorese	54
9.4	Aufreinigung der DNA aus Agarosegelen	55
9.5	Polymerase-Kettenreaktion	55
9.6	Sequenzierung isolierter DNA und PCR-Produkte	56
9.7	Sequenzdatenanalyse	56
9.8	Erstellen eines Sequenz-basierten Stammbaums	56
<b>10</b>	<b>Adhäsionsversuche von Mikroorganismen</b>	<b>57</b>
10.1	Verwendete Oberflächen	57
10.2	Inkubationsbedingungen	57
10.3	Präparation für anschließende Rasterelektronenmikroskopie	57
<b>III</b>	<b>ERGEBNISSE</b>	<b>58</b>

<b>1</b>	<b>Charakterisierung der <i>Acidithiobacillus</i>-Stämme HV2/2 und SP5/1</b>	<b>58</b>
1.1	Morphologische Charakterisierung	59
1.2	Bestimmung der optimalen Wachstumsbedingungen	63
1.3	Substratspektrum	64
1.4	Adhäsionsversuche und Motilität	66
1.4.1	Etablierung neuer Trocknungsverfahren für die Rasterelektronen-mikroskopie	66
1.4.2	Adhäsion von <i>Acidithiobacillus</i> an verschiedene Oberflächen	67
1.5	Phylogenetische Analyse der Stämme	72
<b>2</b>	<b>Charakterisierung des S-Layer Proteins aus dem <i>Acidithiobacillus</i>-Isolat SP5/1</b>	<b>74</b>
2.1	Identifikation des S-Layers und weiterer dominierender Proteine der äußeren Membran	74
2.1.1	Präparation der S-Layer Proteine	74
2.1.2	Identifikation ausgewählter Proteinbanden	75
2.1.3	Bioinformatische Analyse der Proteinsequenzen	77
2.1.4	Das potentielle S-Layer Protein Afe_2303	82
2.2	Untersuchung der Funktionalität des S-Layers mit Hilfe des Laborstammes $\Delta$ Slp90	85
2.2.1	Identifikation des S-Layer defizienten Laborstammes $\Delta$ Slp90	86
2.2.2	Ermittlung der physiologischen Aktivität	87
2.2.3	Komplexierung von $Fe^{3+}$ -Ionen und Verlauf des pH-Wertes	88
2.2.4	Darstellung der Zelloberfläche und Aufbau der Zellwand bei den Stämmen SP5/1 und $\Delta$ Slp90	90
2.2.5	Identifizierung von komplexiertem Eisen in der Zellwand des Stammes SP5/1 mit Hilfe der EDX-Spektroskopie	92
2.2.6	Zellformerhaltende Funktion des S-Layer Proteins Slp90	94
2.3	Dreidimensionale Darstellung der Kontaktstelle zwischen S-Layer und Pyritoberfläche	96
2.4	Immunologische Lokalisation des S-Layers	100
2.5	Vergleichende Darstellung der Oberflächenproteine ausgewählter Typstämme mit Hilfe der Gefrierätzmethode	101
<b>3</b>	<b>Der S-Layer von <i>M. sedula</i> TH2</b>	<b>104</b>
3.1	Proteinsequenzierung und Analyse	104
3.2	Nachweis der Glykosylierung	107
3.3	Immunologische Lokalisation und Freeze-fracture labeling	109
3.4	Dreidimensionale Darstellung der Kontaktstelle zwischen S-Layer und Pyritoberfläche	112
3.5	Adhäsion von Vertretern der Sulfolobales an diverse Oberflächen	117
<b>IV</b>	<b>DISKUSSION</b>	<b>121</b>
<b>1</b>	<b>Die phylogenetische Einordnung der <i>Acidithiobacillus</i>-Stämme SP5/1 und HV2/2</b>	<b>121</b>
1.1	Gemeinsamkeiten und Unterschiede zu bereits beschriebenen <i>Acidithiobacillus</i> -Spezies	121
<b>2</b>	<b>Der S-Layer von <i>Acidithiobacillus</i>: Mehr als nur ein regelmäßiges Oberflächenprotein</b>	<b>123</b>
2.1	Die Symmetrie des S-Layers als phylogenetisches Merkmal	125

2.2	Einfluss des S-Layers auf Adhäsion, Zellform und Fe <sup>3+</sup> -Komplexierung	126
2.3	S-Layer, Porin oder doch EPS?	130
3	Der S-Layer von <i>M. sedula</i> und dessen Rolle bei der Interaktion mit Pyrit	131
<b>V</b>	<b>VORSCHLÄGE ZUR EINORDNUNG DER ISOLATE SP5/1 UND HV2/2 SOWIE BESCHREIBUNG EINER NEUEN SPEZIES</b>	<b>136</b>
1	Die Neueinordnung von „ <i>Thiobacillus sphaeroides</i> “ SP5/1 als <i>A. ferrooxidans</i> comb. nov.	136
2	Die Beschreibung der neuen Art <i>Acidithiobacillus striatothermus</i> sp. nov.	136
<b>VI</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG</b>	<b>138</b>
<b>VII</b>	<b>ANHANG</b>	<b>140</b>
1	Abkürzungsverzeichnis	140
2	Begleit-DVD	142
3	Tabellen	144
3.1	Verwendete Organismen	144
3.2	Verbrauchsmaterialien	145
3.3	Kippwinkel für Tomographie nach Saxton <i>et al.</i> (1984)	146
3.4	Medienzusätze	148
4	Ergänzende Abbildungen	149
<b>VIII</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS</b>	<b>151</b>
<b>IX</b>	<b>PUBLIKATIONEN</b>	<b>174</b>



# I Einleitung

## 1 ‚Acid mine drainage‘ als Folge der biotischen Oxidation von Pyrit

Im Zuge der Industrialisierung und dem damit verbundenen Abbau von Rohstoffen wie Kohle und verschiedenster Metallerze sind gerade in neuerer Zeit Umweltproblematiken aufgetreten, deren Vermeidung, Verminderung oder Rückführung zunehmend an Bedeutung gewinnen (Zipper und Skousen, 2010). Gerade im Kohlebergbau und der Gewinnung von Metallerzen führt die Versauerung der Böden durch sogenannte saure Grubenwässer (*Acid mine drainage*, AMD) zu einer dauerhaften Schädigung der Biosphäre in diesen Bereichen. Dabei spielt nicht nur die Bildung von Schwefelsäure durch die Oxidation von Schwefel und Sulfiden eine Rolle, sondern auch der Eintrag von gelösten Schwermetallen. Eine Dokumentierungen von Umweltschäden, deren primäre Ursache der Bergbau ist, liegen mittlerweile für Asien (David, 2003), Neuseeland (Winterbourn *et al.*, 2000), Europa (Casiot *et al.*, 2009; Gray und Delaney 2008) und die USA vor (Cherry *et al.*, 2001; Freund und Petty, 2007; Courtney und Clements, 2000; Kennedy *et al.*, 2003; Soucek *et al.*, 2000). Dies verdeutlicht, dass es sich dabei keineswegs nur um ein lokales, sondern um ein globales Problem handelt.

Für den biotischen Anteil der AMD sind unter moderaten Temperaturen bis etwa 40 °C in erster Linie mesophile Bakterien der Gruppe *Acidithiobacillus* verantwortlich, einer Subdomäne der  $\gamma$ -Proteobakterien. Ab Temperaturen von etwa 50 °C wird die Oxidation von Schwefel und auch Metallsulfiden vor allem von säureliebende Crenarchaeen der Ordnung Sulfolobales durchgeführt.

Ein Zusammenhang zwischen der Anwesenheit von Mikroorganismen und der Laugung von Metallerzen wurde erstmals im Jahre 1962 gezeigt (Razzell und Trussell, 1963). Die ersten Bakterien, die in diesem Zusammenhang beschrieben wurden und zur Schwefeloxidation fähig sind, gehörten zur Gattung *Acidithiobacillus*, welche bis zu ihrer Neuklassifizierung durch Kelly und Wood (2000) als *Thiobacillus* bezeichnet wurden (Nathanson, 1902). Bereits sehr früh wurde eine Beteiligung der Acidithiobacillen an der Schwefeloxidation und Mobilisierung von Metallen aus Erzen vermutet. Als erstes gelang die Isolierung und Identifizierung des autotrophen Bakteriums *Acidithiobacillus thiooxidans* aus schwefel- und phosphatreichen Böden (Waksman und Jaffe, 1921; Waksman und Jaffe, 1922). Die Erkenntnis, dass Mikroorganismen an der biologischen Laugung von Metallen beteiligt sind, deutete auf ihre Bedeutung, insbesondere für die wirtschaftliche Aufarbeitung von Metallerzen mit niedrigem Metallgehalt, bereits hin (Rudolfs *et al.*, 1922). Das erste beschriebene Bakterium, *Acidithiobacillus ferrooxidans*, das zur Oxidation sowohl von Schwefel als auch von Eisen fähig ist, wurde erstmals 1947 durch Colmer und Hinkle isoliert (Colmer und Hinkle, 1947). Vertreter dieser acidophilen und autotrophen Spezies konnten im

Drainagewasser diverser Erzminen nachgewiesen werden (Colmer *et al.*, 1950; Temple und Colmer, 1951; Temple und Delchamps, 1953; Leathen *et al.* 1953), die Rolle der Mikroorganismen an der Oxidation von Metallsulfiden wurde in diversen nachfolgenden Arbeiten beschrieben (Bryner *et al.*, 1957; Malouf und Prater, 1961; Silverman *et al.*, 1961). Schon früh wurde eine direkte Beteiligung der Mikroorganismen an der Oxidation von Pyrit in Erwägung gezogen (Silverman und Ehrlich, 1964). Aufgrund dessen rückten die zugrundeliegenden Mechanismen, die beteiligten Enzyme und die Interaktion der Mikroben mit den Substratoberflächen zunehmend in den Fokus der Wissenschaft.

Eisenerze stellen einen Anteil von etwa 3.5 % der 3500 in der Erdkruste vorkommenden Mineralien dar. Neben den hauptsächlich auftretenden oxidischen Verbindungen wie Magnetit, Hämatit, Brauneisenstein, Limonit, Vivianit und Siderit ist insbesondere die sulfidische Eisenverbindung Pyrit ( $\text{FeS}_2$ ) industriell von Bedeutung. In der Vergangenheit wurde es aufgrund seines goldähnlichen Glanzes oft mit diesem Edelmetall verwechselt und erhielt den Beinamen Narrengold (fools gold) oder Katzensgold. Tatsächlich ist Gold in nicht unerheblicher Masse als Verunreinigung eingelagert in Pyrit enthalten. Einige Prozent der Eisenatome im Kristallgitter können ersetzt sein durch Elemente wie Silber, Gold, Cadmium, Kobalt, Kupfer, Quecksilber, Molybdän, Nickel, Blei, Ruthenium, Zinn, Thallium oder Zink. Des Weiteren können sich an den Gitterpositionen des Schwefels auch Arsen, Wismut, Antimon, Selen und Tellur finden (Abraitis *et al.*, 2004).

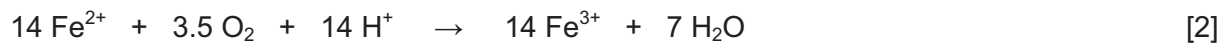
Die Kristallstruktur von Pyrit lässt sich vom Na-Cl-Gitter ableiten. Zwei Abarten von Pyrit sind Markasit, mit gleicher Summenformel aber abweichender Kristallstruktur, und Bravoit, das zusätzlich Nickel enthält (Riedel, 2004).

Die Oxidation von Pyrit kann auf biotischem und auf abiotischem Wege erfolgen. Die Tatsache, dass sich Pyrit auch durch die Zugabe von  $\text{Fe}^{3+}$ -Ionen oxidieren lässt (Gleichung [1]; Fowler *et al.*, 1999; Larsson *et al.*, 1993), nutzte man in diversen Laugungsexperimenten, um die abiotische Oxidation mit biotischen Laugungsversuchen vergleichen zu können (Etzel, 2008; Etzel *et al.*, 2008). Die sowohl in der biotischen als auch abiotischen Laugung entstehenden  $\text{H}^+$ -Ionen führen zu einer Ansäuerung des umgebenden Mediums und in natürlichen Umgebungen zu der bereits erwähnten AMD.

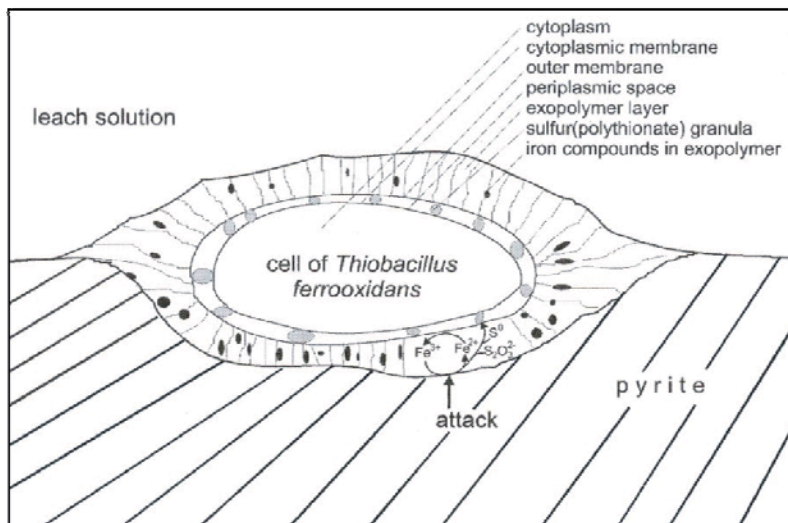


Der sinkende pH-Wert erhöht zugleich die Stabilität von  $\text{Fe}^{2+}$  in Lösung, da dieses unter aeroben Bedingungen bei neutralem pH-Wert relativ schnell oxidiert und somit für die Mikroorganismen nicht mehr als Elektronendonator zur Verfügung stehen würde (Valdés *et al.*, 2008). Die abiotisch gebildeten  $\text{Fe}^{2+}$ -Ionen (Gleichung [1]) können nun auf biotischem Wege durch Mikroorganismen zu  $\text{Fe}^{3+}$  oxidiert werden (Gleichung [2]) und stehen somit erneut zur

Oxidation von Pyrit zur Verfügung. Sie wirken damit quasi als Katalysator für die Zersetzung von Pyrit (Fowler *et al.*, 1999; Larsson *et al.*, 1993).



Diese Art des Pyritabbaus wird in der Literatur als „non contact“-Mechanismus bezeichnet, da kein direkter Kontakt zwischen Zellen und Pyritoberfläche für die Erzlaugung erforderlich ist und die Oxidation von  $\text{FeS}_2$  abiotisch durch  $\text{Fe}^{3+}$  erfolgt (Rohwerder *et al.*, 2003). Im Gegensatz dazu ist der sogenannte „contact“-Mechanismus beschrieben. Dabei geht man davon aus, dass  $\text{Fe}^{3+}$ -Ionen in einer extrazellulären polymeren Substanz (EPS) komplexiert werden und Pyrit lokal an der Kontaktstelle der Mikroorganismen mit der Erzoberfläche abgebaut wird (Abbildung 1; Gehrke *et al.*, 1998; Sand und Gehrke, 2006; Sand *et al.*, 2009). Auf eine vergleichbare Akkumulation von Schwermetallen an der Zelloberfläche am Beispiel *Bacillus sphaericus* JG-A12, für den die Komplexierung von Uran im S-Layer beschrieben wurde (Merroun *et al.*, 2005; Pollmann *et al.*, 2006)), wird in Abschnitt I.3 im Detail eingegangen.



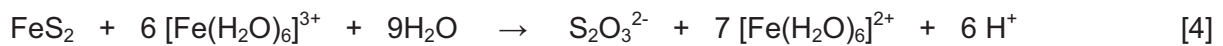
**Abbildung 1:** Schematische Darstellung der Interaktion von *A. ferrooxidans* mit der Pyritoberfläche, wie sie allgemein für den sogenannten „contact“-Mechanismus angenommen wird. Aus Sand *et al.* (2009).

Ein direkter Kontakt der Zellen mit der Oberfläche, häufig in Form eines Biofilms, kann dazu führen, dass sich das Redoxpotential lokal verändert. So bildet sich eine Mikroumgebung (acid nanoenvironment), welche die Oxidation von Pyrit, die Reaktivität beteiligter Enzyme oder die Energieausbeute steigern kann (Mielke *et al.*, 2003; Bergel, 2007).

Auf die Bedeutung des „contact“-Mechanismus auch für Archaeen wird in Arbeiten an *Acidianus brierleyi* hingewiesen, in denen festgestellt wurde, dass ein direkter Kontakt zwischen Zellen und Pyritoberfläche den Abbau des Sulfids positiv beeinflusst (Larsson *et al.*, 1993). Die dabei gebildeten  $\text{Fe}^{3+}$ -Ionen stehen dabei lokal direkt wieder zur Oxidation von  $\text{FeS}_2$  zur Verfügung (Gleichung [3]). In diesem Fall wird von folgender Reaktionsgleichung ausgegangen:



Generell geht man beim Abbau unlöslicher Sulfide wie Pyrit vom sogenannten Thiosulfat-Stoffwechselweg aus (Rohwerder *et al.*, 2003). Es wurde jedoch bislang die Meinung vertreten, dass die nach Gleichung [3] gebildeten  $\text{Fe}^{3+}$ -Ionen komplexiert im EPS vorliegen und es durch den direkten Kontakt dieser Substanz mit der Pyritoberfläche zur Oxidation von  $\text{FeS}_2$  kommt (Sand *et al.*, 2006). Hierbei werden Protonen,  $\text{Fe}^{2+}$ -Ionen und das bereits angesprochene Thiosulfat als Zwischenprodukt freigesetzt:



Bei *A. ferrooxidans* werden die bei der Regeneration der  $\text{Fe}^{3+}$ -Ionen (Gleichung [2]) freigesetzten, energiereichen Elektronen vermutlich durch Cytochrom c2 als primäre Oxidase in der äußeren Membran befindet auf Rusticyanin übertragen, das gewissermaßen als Elektronenspeicher dient (Abbildung 2 A). Anderen Pyrit-oxidierenden Mikroorganismen ohne Rusticyanin, wie *Leptospirillum ferrooxidans*, besitzen vermutlich eine eigene Form der Eisenoxidase, welche die bei der Umsetzung von  $\text{Fe}^{2+}$  zu  $\text{Fe}^{3+}$  gewonnenen Elektronen auf ein Säure-stabiles Cytochrom a überträgt (Blake *et al.*, 1989; Takai *et al.*, 2001; Rawlings, 2001).

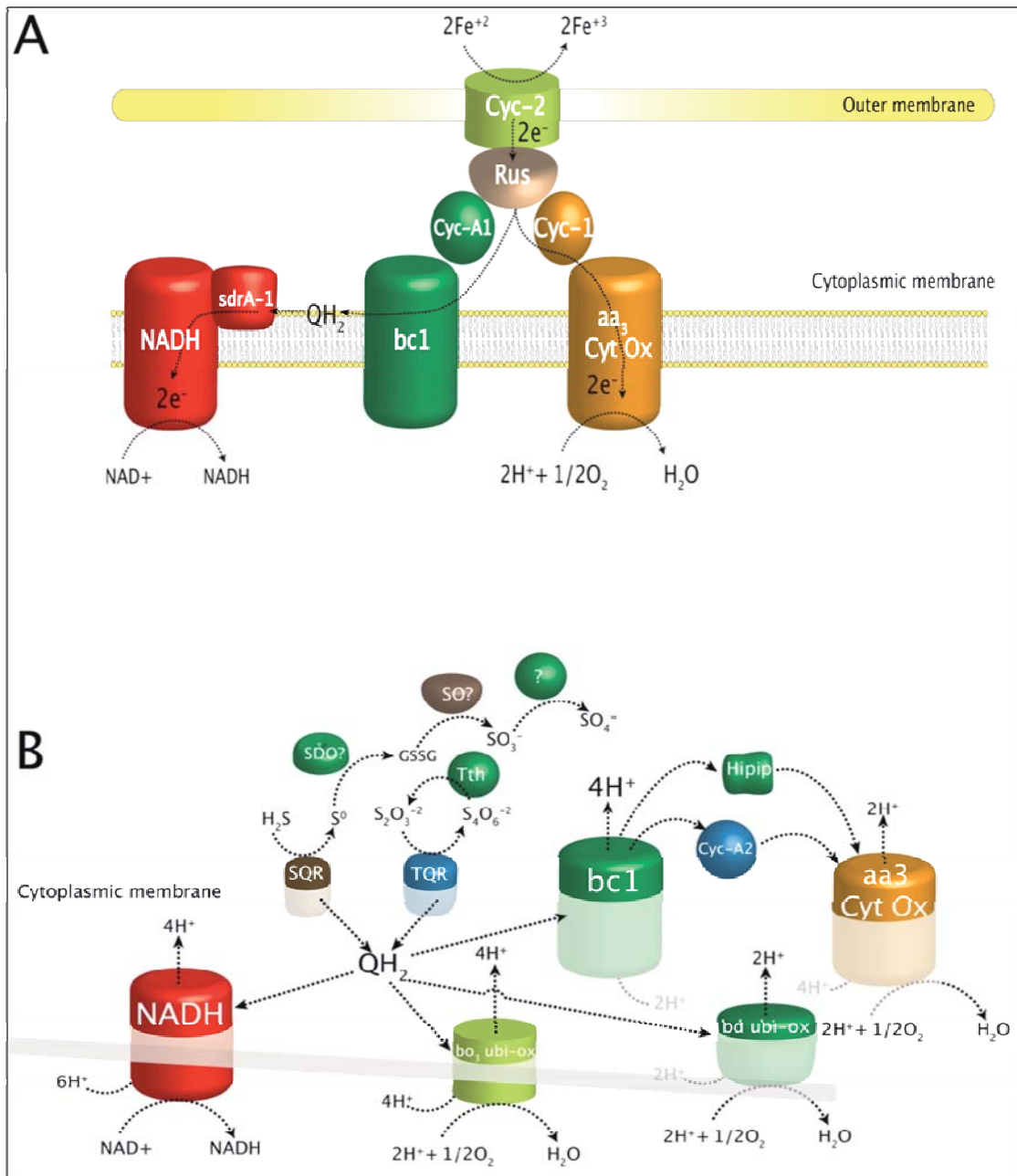
Die in Rusticyanin gespeicherten Elektronen werden in einem „downhill electron pathway“ über Cytochrom c1 auf eine in der Cytoplasmamembran lokalisierte  $\text{aa}_3$  Cytochrom-Oxidase übertragen. Diese reduziert dann ihrerseits Sauerstoff als finalen Elektronenakzeptor (Valdés *et al.*, 2008). In einem Energie-verbrauchenden Prozess, der auch als „uphill electron pathway“ bezeichnet wird, kann Rusticyanin auch Elektronen über Cytochrom c-A1 auf einen  $\text{bc}_1$ -Komplex in der Cytoplasmamembran übertragen. Über einen Ubiquinon-Pool gelangen die Elektronen zu einer NADH-abhängigen Dehydrogenase, die  $\text{NAD}^+$  zu NADH reduziert

(Brasseur *et al.*, 2002; Valdés *et al.*, 2008). Die für diesen Prozess benötigte Energie stammt vermutlich aus der Oxidation von  $\text{Fe}^{2+}$  mit Sauerstoff. Cytochrom c2 bildet also sehr wahrscheinlich die für die Laugung von Pyrit benötigten  $\text{Fe}^{3+}$ -Ionen und nicht, wie ursprünglich vermutet, ein als HiPIP („high potential iron-sulfur protein“) bezeichnetes Protein (Cavazza *et al.*, 1995; Bruscella *et al.*, 2005), welches vermutlich an der Schwefeloxidation beteiligt ist. Reduzierte anorganischen Schwefelverbindungen (RISCs) wie etwa  $\text{H}_2\text{S}$  werden über eine Sulfid/Quinon Oxidoreduktase in der Cytoplasmamembran zu Schwefel oxidiert (Abbildung 2 B; Valdés *et al.*, 2008). Über einen noch nicht im Detail erfassten Polysulfidweg (Schippers und Sand, 1999) bildet sich aus dem Schwefel Polysulfid (GSSG), das zu Sulfit ( $\text{SO}_3^-$ ) und schließlich zu Sulfat ( $\text{SO}_4^{2-}$ ) oxidiert wird. Das in Gleichung [4] gebildete Thiosulfat ( $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$ ) wird im Periplasma zu Tetrathionat ( $\text{S}_4\text{O}_6^{2-}$ ) umgesetzt. Daran ist eine Tetrathionathydrolase beteiligt, die zusätzlich zu *A. ferrooxidans* auch in *Acidithiobacillus caldus* nachgewiesen werden konnte (Rzhepishevskaja *et al.*, 2007). Sowohl die Elektronen aus dieser Reaktion als auch aus der Oxidation der RISCs werden auf einen Quinon-Pool übertragen. Von dort können sie auf den bereits erwähnten  $\text{bc}_1$ -Komplex übertragen werden, der daraufhin vier Protonen nach außen ins Periplasma transportiert. Ein weiterer Elektronentransport über HiPIP bzw. Cytochrom c-A2 führt zur  $\text{aa}_3$  Cytochrom-Oxidase, die zusätzlich zwei Protonen aus dem Cytoplasma ins Periplasma transportiert und gleichzeitig Sauerstoff reduziert. Die Übertragung von Elektronen aus dem Quinon-Pool auf eine  $\text{bo}_3$ - oder eine  $\text{bd}$ -Quinon-Oxidase führt ebenfalls zur Reduktion von Sauerstoff als finalem Elektronenakzeptor und zur Abgabe von vier bzw. zwei Protonen in den periplasmatischen Raum. Bei einem Transfer von Elektronen aus dem Quinon-Pool auf eine NADH-abhängige Dehydrogenase wird auch hier  $\text{NAD}^+$  zu NADH reduziert. In diesem Prozess werden ebenfalls vier Protonen an den Bereich außerhalb der Cytoplasmamembran abgegeben.

Die Protonen, die sich durch die beschriebenen Prozesse im Periplasma ansammeln werden im weiteren Verlauf zum Teil an das umgebende Medium abgegeben und führen zu dem bereits erwähnten Absinken des pH-Wertes (*acid micro environment*) oder werden durch den entstehenden Protonengradienten zur ATP-Synthese genutzt.

Zusätzlich zum Einfluss eines direkten Kontakts zwischen Mikroorganismen und der Kristalloberfläche von Pyrit und den Prozessen bei der Oxidation von  $\text{Fe}^{2+}$  und RISCs, so wie sie sich mit hoher Wahrscheinlichkeit in *A. ferrooxidans* abspielen, gab es ebenfalls Untersuchungen zum Einfluss der Temperatur auf die Laugung von Pyrit. In vergleichenden Versuchsreihen mit mesophilen Bakterien sowie thermophilen Bakterien und Archaeen konnte gezeigt werden, dass höhere Temperaturen die Laugungsrate von Pyrit ebenso erhöhen wie ein direkter Kontakt mit dem Erz (Duarte *et al.*, 1993; Nemati und Harrison, 2000). Deshalb wurden auch in Rahmen dieser Arbeit Mikroorganismen mit optimalen

Wachstumsbereichen im mesophilen, moderat thermophilen und thermophilen Temperaturbereich untersucht.



**Abbildung 2:** Modell für die Oxidation von  $\text{Fe}^{2+}$  (A) und Reduzierten anorganischen Schwefelverbindungen (B) in *A. ferrooxidans*. Sie dient der schematischen Darstellung der an diesen Prozessen beteiligten Enzyme und Proteinkomplexe. Die Erläuterung der einzelnen Elemente erfolgt im Text. Entnommen aus Valdés *et al.* (2008).

## 2 Die Gattung *Acidithiobacillus*

Zu den gültig beschriebenen Arten innerhalb der Gattung *Acidithiobacillus* zählen neben den mesophilen Spezies *A. ferrooxidans* und *A. thiooxidans* auch noch *A. caldus* (Hallberg und Lindström, 1994) und *A. ferrivorans* (Hallberg *et al.*, 2010). Der tatsächliche Status einer fünften Spezies, *A. albertensis*, ist innerhalb dieser Gruppe noch nicht endgültig geklärt (Kelly und Wood, 2000). Bei allen fünf Spezies handelt es sich um Gram-negative, stäbchenförmige  $\gamma$ -Proteobakterien mit einem Durchmesser von 0.5 bis 0.7  $\mu\text{m}$  und einer Länge von 1.0 bis 2.4  $\mu\text{m}$  (Hallberg *et al.*, 2010). Weitere Gemeinsamkeiten sind die Fähigkeit zur Energiegewinnung aus der Oxidation von Schwefel und reduzierten Schwefelverbindungen (Valdés *et al.*, 2009), das Wachstum bei extrem hohen Schwermetall-Konzentrationen (Rawlings, 2005), die Synthese extrazellulärer polymerer Substanzen (Barreto *et al.*, 2005) und die Möglichkeit zur Fixierung atmosphärischen Kohlenstoffs über den Calvin-Benson-Bassham Zyklus (Appia-Ayme *et al.*, 2006; Levican *et al.*, 2008; Valdés *et al.*, 2008).

Lediglich für *A. ferrooxidans* konnte gezeigt werden, dass ein Wachstum chemolithotroph auf Sulfidmineralen wie Pyrit sowie  $\text{Fe}^{2+}$  möglich ist. Für die Oxidation des Eisens wird dabei das Vorhandensein von Cytochrom c2 in Verbindung mit Rusticyanin als Charakteristikum angesehen (Valdés *et al.*, 2009). Vertreter dieser Gattung sind außerdem in der Lage, atmosphärischen Stickstoff zu fixieren (Norris *et al.*, 1995) sowie anaerob mit  $\text{Fe}^{3+}$  als Elektronenakzeptor zu wachsen (Hallberg *et al.*, 2001; 2010). Sowohl bei *A. ferrooxidans* als auch bei *A. caldus* ist ein Wachstum mit Wasserstoff als Elektronendonator möglich (Hallberg *et al.*, 2010). Während für den Typstamm *A. ferrooxidans* (DSM 14882<sup>T</sup>, ATCC 23270<sup>T</sup>) keine Motilität nachgewiesen werden konnte (Hallberg *et al.*, 2010), handelt es sich bei Letzterem um ein motiles Bakterium mit einer polaren Flagelle, einer optimalen Wachstumstemperatur von 45 °C (32 °C – 52 °C) und einem pH-Optimum zwischen 2.0 und 2.5 (Hallberg und Lindström, 1994). Bei den bisher beschriebenen Vertretern der Spezies konnte chemolithotrophes Wachstum auf reduzierten Schwefelverbindungen ebenso wie auf Wasserstoff als Elektronendonator sowie mixotrophes Wachstum mit Schwefel oder Tetrathionat und Glucose oder Hefeextrakt nachgewiesen werden. Weder der Typstamm *A. caldus* (DSM 8584<sup>T</sup>) noch andere bisher beschriebenen Vertreter sind in der Lage, mit  $\text{Fe}^{2+}$  in Form von Eisensulfat oder Pyrit als Substrat zu wachsen. Sie besitzen zwar die Möglichkeit zur Aufnahme von Ammonium, nicht aber zur Fixierung atmosphärischen Stickstoffs (Norris *et al.*, 1995). Bei Temperaturen über 40 °C in natürlichen Habitaten wie auch in Biolaugungsreaktoren gehören sie zusammen mit *Leptospirillum spp.* zur vorherrschenden Spezies (Goebel und Stackebrandt, 1994; Norris *et al.*, 2000; Rawlings, 2005). Hierbei ist *A. caldus* der dominierende Schwefeloxidierer und entfernt so Schwefelablagerungen, die sich an der Erdoberfläche bilden können und die Pyrit-Oxidation durch *Leptospirillum spp.* inhibieren könnten (Semenza *et al.*, 2002). Ebenso konnte eine

erhöhte Freisetzung von Kupfer aus Chalcopyrit durch *L. ferriphilum* bei der Anwesenheit von *A. caldus* gezeigt werden (Zhou *et al.*, 2007). Der erste beschriebene Vertreter der Gattung *Acidithiobacillus*, *A. thiooxidans* (Waksman und Jaffe, 1921; 1922) ist wie auch *A. caldus* außer Stande, Sulfidminerale und  $\text{Fe}^{2+}$  als Elektronendonoren zu nutzen, anaerob mit  $\text{Fe}^{3+}$  zu wachsen (Hallberg *et al.*, 2001) oder atmosphärischen Stickstoff zu fixieren (Norris *et al.*, 1995; Valdés *et al.*, 2008).

Die erst kürzlich beschriebene Spezies *A. ferrivorans* ist wie *A. ferrooxidans* dazu fähig, atmosphärischen Stickstoff zu fixieren, anaerob mit  $\text{Fe}^{3+}$  zu wachsen und sowohl Sulfidminerale als auch  $\text{Fe}^{2+}$  als Elektronendonoren zu nutzen. Abweichend von *A. ferrooxidans* wurde für *A. ferrivorans* zusätzlich die Oxidation löslicher Sulfide und Wachstum auch noch bei 4 °C gezeigt. Einige Vertreter können zudem elementaren Wasserstoff als Energiequelle nutzen. Im Gegensatz zu *A. ferrooxidans* ist *A. ferrivorans* in der Lage, Sulfide zu oxidieren. Ebenso wie bei *A. thiooxidans* und *A. caldus* konnte eine Motilität der Zellen festgestellt werden (Hallberg *et al.*, 2010).

### **3 Surface layer - Regelmäßig angeordnete 2D-Proteinkristalle**

Laut Definition ist ein S-Layer (*surface layer*) ein Oberflächenprotein, das sich in einem entropischen Prozess in einem regelmäßigen zweidimensionalen Gitter anordnet und die gesamte Zelloberfläche bedeckt (Sleytr *et al.*, 1988; Eichler, 2003; Sleytr *et al.*, 2007). Je nach Anordnung der identischen Proteinuntereinheiten bilden sich dabei mehr oder weniger hoch geordnete pseudo-kristalline Bereiche mit p1-, p2-, p3-, p4- oder p6-Symmetrie aus. Dabei hat sich insbesondere bei Untersuchungen an archaellen Vertretern wie den Sulfolobales (p3-Symmetrie) und Thermoproteales (p6-Symmetrie) gezeigt, dass sowohl die Symmetrie als auch die räumliche Anordnung der Untereinheiten, die Gitterkonstante, der Winkel zwischen den Gittervektoren sowie die Dicke des S-Layers innerhalb einer Ordnung in hohem Maße konsistent sind und sich daher in begrenztem Maße als taxonomisches Merkmal eignen (Baumeister und Lembcke, 1992; Rachel, 1999; König *et al.*, 2007). Man findet S-Layer-Proteine aber nicht nur bei den bereits angesprochenen Archaeen, bei denen sie neben der Cytoplasmamembran oft die einzige Zellwandkomponente darstellen, sondern auch bei Bakterien und einigen Algen (Rachel *et al.*, 1997).

In der Regel erfolgt die Verankerung des Proteins in der Cytoplasmamembran (König *et al.*, 2007). Ausnahmen sind einige methanogene Archaeen wie *Methanothermus*: Bei ihnen ist das Oberflächenprotein mit dem Pseudomurein assoziiert. In Gram-positiven Bakterien ist der S-Layer im Peptidoglykan verankert. Dies geschieht meist über die sogenannte SLH-Domäne (*S-layer homology*; Mesnage *et al.*, 2000), eine Domäne bzw. ein Motif das aus etwa 55 Aminosäuren besteht - 10 bis 15 davon sind konserviert - und bisher in mehr als 40

Proteinen gefunden wurde, zu denen auch einige S-Layer Gram-negativer Bakterien gehören. Zuweilen besteht bei Gram-negativen Bakterien auch eine Interaktion des S-Layers mit der äußeren Membran und hier speziell mit dem Lipopolysaccharid (LPS; Boot und Pouwels, 1996; Engelhardt und Peters, 1998; Sára und Sleytr, 2000). Mit Hilfe der ‚*linker insertion mutagenesis*‘ konnte für das S-Layer-Protein RsaA des Gram-negativen Bakteriums *Caulobacter crescentus* gezeigt werden, dass dieses Protein eine N-terminale Ankerregion und ein C-terminales Sekretionssignal aufweist (Bingle *et al.*, 1997). Desweiteren wurde gezeigt, dass das Fehlen eines S-Layers nicht zwangsläufig bedeuten muss, dass auch die genetische Grundlage dazu fehlt. Sogenannte „ruhenden Gene“ wurden in *Campylobacter fetus* und *Lactobacillus acidophilus* nachgewiesen (Boot und Pouwels, 1996). Diese Gene können bei einem Teil der Bakterienpopulation durch eine Inversion chromosomaler Elemente und die daraus resultierende Platzierung in die Nähe eines aktiven Promotors exprimiert werden (Boot und Pouwels, 1996).

Häufig bei S-Layer-Proteinen zu beobachten ist eine sehr starke Glykosylierung der Proteine. Im Extremfall kann dies sogar bedeuten, dass die Zellwand komplett aus Glykoproteinen aufgebaut ist (Sára und Sleytr, 2000; Messner und Schäffer, 2003). Beispielhaft wurde dies bei einigen Euryarchaeen wie *Archaeoglobus fulgidus* (Zellner *et al.*, 1989), *Methanoplanus limicola* (Cheong *et al.*, 1991) und *Methanoculleus marisnigri* (Bayley und Koval, 1994) sowie bei diversen Crenarchaeen wie *Pyrodictium abyssi* (Pley *et al.*, 1991), *Sulfococcus mirabilis* (Bashkatova *et al.*, 1991), *Acidianus ambivalens* und *Metallosphaera sedula* (Veith *et al.*, 2009) gezeigt. Glykosylierte S-Layer-Proteine konnten unter den Bakterien bisher nur bei Gram-positiven Vertretern der *Bacillaceae* gezeigt werden (Messner und Schäffer, 2000). Im Gegensatz dazu steht der Beweis für einen glykosylierten S-layer bei Gram-negativen Bakterien bisweilen noch aus.

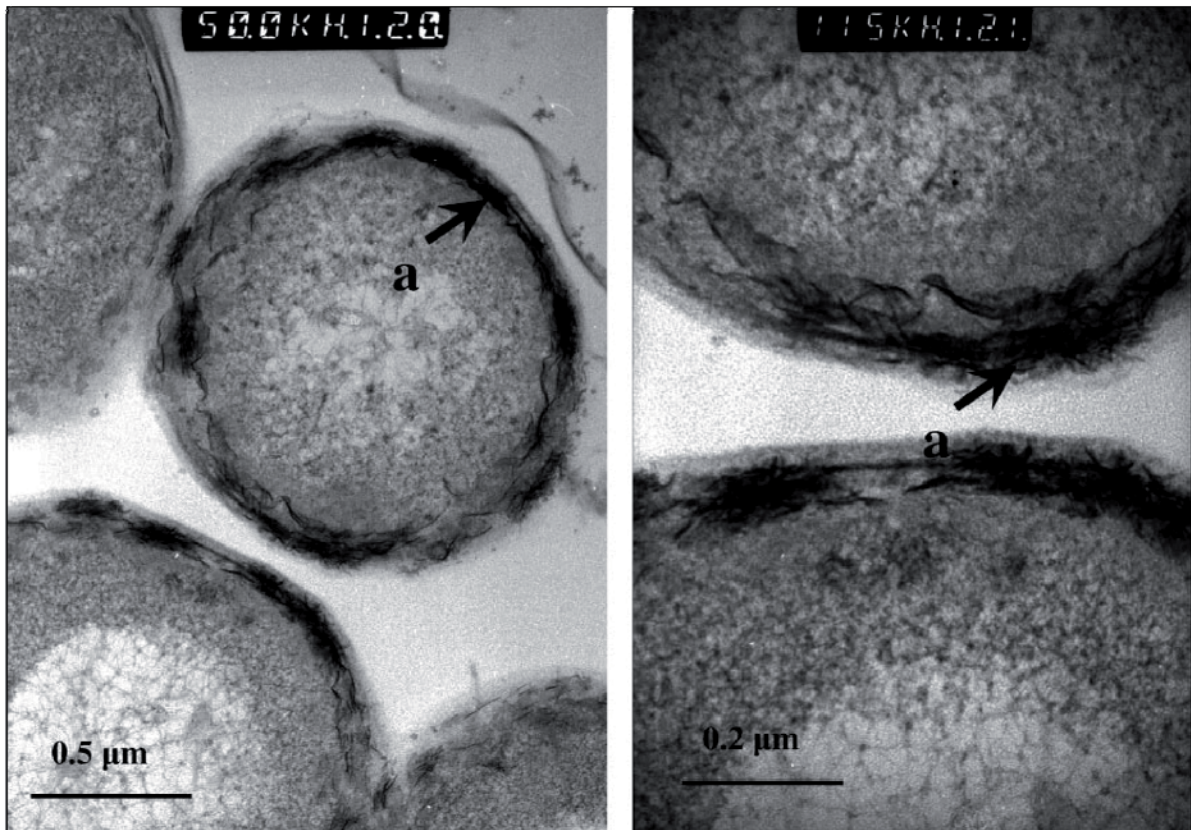
Üblicherweise bestehen S-Layer aus einer oder zwei (Glyko-)Proteinuntereinheiten mit einer Molekularmasse zwischen 40 und 210 kDa (König *et al.*, 2007). Dabei hat sich gezeigt, dass die Aminosäuresequenzen eine hohe Variabilität aufweisen. Die Sequenzen der S-Layer von Methanococcales zeigen gewisse Ähnlichkeiten zu entsprechenden Proteinen bei den Thermococcales, jedoch nicht zu Archaeen anderer Gruppen (Claus *et al.*, 2002; König *et al.*, 2007). Bei *Sulfolobus acidocaldarius* und *S. solfataricus* konnte gezeigt werden, dass der S-Layer aus zwei Hauptkomponenten aufgebaut ist, die durch hydrophobe Wechselwirkungen miteinander verbunden sind (Grogan, 1996; Veith *et al.*, 2009): Aus der großen S-Layer-Untereinheit SlaA, die quasi die Kuppel der Zellwand darstellt, und der kleinen Untereinheit SlaB, die den S-Layer wie die Säulen eines Doms über eine C-terminale Transmembranhelix in der Cytoplasmamembran verankert. Eine elektronenmikroskopische Darstellung der dünnen Ankerstrukturen ist meist sehr schwierig: Sie sind mitunter sehr flexibel und reagieren empfindlich auf die gängigen Extraktionsmethoden mit Detergenz,

kombiniert mit differentieller Zentrifugation, wie sie üblicherweise bei der Präparation von S-Layer-Proteinen angewendet werden (Baumeister und Lembcke, 1992; Lembcke *et al.*, 1993). Die auch als Stalk bezeichnete Ankerstruktur des S-Layers spannt dabei im Fall von *Staphylothermus marinus* einen bis zu 70 nm weiten, pseudoperiplasmatischen Raum auf (Peters *et al.*, 1995; 1996). Bei dem Raum zwischen Cytoplasmamembran und dem S-Layer wird bewusst von einem Pseudoperiplasma gesprochen, da ein Periplasma per Definition von zwei Membranen begrenzt wird. Trotzdem schirmt der S-Layer das Cytoplasma vom umgebenden Medium ab. Den eingeschlossenen Bereich bezeichnet man deshalb als Quasi- oder Pseudoperiplasma (Messner *et al.*, 1986; Baumeister und Lembcke, 1992). Bei den bisher beschriebenen *Sulfolobus*-Arten beträgt die Entfernung zwischen der Membran und dem S-Layer-„Dach“ etwa 20 nm, die minimale Dicke dieser äußersten Proteinschicht etwa 4.8 nm (Mark *et al.*, 2006). Durchbrochen wird die Schicht durch Poren mit einem Durchmesser von 4 bis 5 nm, die gelösten Stoffen das Eindringen in das Pseudoperiplasma ermöglichen.

Bei *Staphylothermus marinus* ist der Membrananker zusätzlich mit einer Protease (STABLE) assoziiert (Peters *et al.*, 1995). Deswegen ist nicht auszuschließen, dass auch weitere extrazelluläre Enzyme - möglicherweise sogar mit Stoffwechsel-relevanter Funktion – oder extrazelluläre Enzyme an den S-Layer gebunden sind (Matuschek *et al.*, 1994). Für den S-Layer von *Bacillus sphaericus* JG-A12 konnte gezeigt werden, dass er in der Lage ist, Uran und andere Schwermetalle zu binden und an der Zelloberfläche zu akkumulieren (Abbildung 3; Merroun *et al.*, 2005; Pollmann *et al.*, 2006).

Desweiteren können S-Layer für Adhäsion bzw. Interaktion mit Oberflächen verantwortlich sein (Rachel *et al.*, 1997) und damit sogar die Pathogenität einiger Mikroorganismen wie z.B. *Aeromonas salmonicida* mit beeinflusst (Garduno *et al.*, 1995). Sowohl bei pathogenen Bakterien als auch bei nicht-pathogenen Vertretern wie *Lactobacillus ssp.* konnte eine Interaktion des S-Layers mit Epithelzellen des Wirts gezeigt werden (Borinski und Holt, 1990; Toba *et al.*, 1995; Frece *et al.*, 2005). Interessant erscheint auch der Einfluss des S-Layers auf die Widerstandsfähigkeit gegen radioaktive Strahlung. So scheint bei *B. cereus* eine, um den Faktor 2.6, erhöhte Resistenz gegen  $\gamma$ -Strahlung mit dem Vorhandensein eines S-Layer Proteins einherzugehen (Kotiranta *et al.*, 1999).

Neben der Funktion als Barriere bzw. Molekularsieb zum umliegenden Medium (Paula *et al.*, 1988), als Ansatzpunkt für Enzyme oder als adhäsive Struktur kann zumindest den S-Layern von *Thermoproteus tenax* und *Pyrobacculum spp.* eine Zellform-unterstützende Funktion zugeschrieben werden. Die in diesen Organismen beobachtete charakteristische räumliche Verteilung der Proteine erlaubte es zusätzlich, sie alleine aufgrund dessen von anderen (Cren-)Archaeen zu unterscheiden (Messner *et al.*, 1986; Baumeister *et al.*, 1989; Phipps *et al.*, 1990).



**Abbildung 3:** Elektronenmikroskopische Aufnahmen von *B. sphaericus* JG-A12. Die Darstellung zeigt Ultradünnschnitte von Zellen, welche mit Uran inkubiert wurden. Hierbei zeigt sich eine Anreicherung des Metalls an der Zelloberfläche (a). Aus Merroun *et al.* (2005).

Regelmäßige S-Layer-Proteine konnten als äußerste Zellwandstruktur bei den Pyritoxidierenden Sulfoloben *Metallosphaera sedula* TH2 und *Sulfolobus metallicus* Kra23 sowie den *Acidithiobacillus*-Isolaten SP5/1 und HV2/2 identifiziert werden (Klingl, 2007). Die Rolle der S-Layer Proteine im Zusammenhang mit der mikrobiellen Pyritoxidation ist jedoch unbekannt. Aus diesem Grund sollten weiterführende Untersuchungen an den jeweiligen Proteinen Aufschluss über mögliche Funktionen geben.

#### 4 Der S-Layer der Sulfolobales – *Acidianus*, *Sulfolobus* und *Metallosphaera*

Zur Ordnung der Sulfolobales gehören drei acidophile und thermophile Gattungen: *Acidianus*, *Sulfolobus* und *Metallosphaera*. Sie alle weisen eine mehr oder weniger gelappte kokkoide Zellform mit Durchmessern von 0.8 bis 1.2 μm auf. Der Cytoplasmamembran ist als einzige Zellwandkomponente ein S-Layer mit p3-Symmetrie aufgelagert (König *et al.*, 2007). Die bisher beschriebenen S-Layer-Proteine einzelner *Sulfolobus*-Spezies hatten apparente Massen von mindestens 110 kDa im Falle der großen Untereinheit und 42 bis 60 kDa im Falle der kleinen Untereinheit (Grogan, 1989; 1996). Bisher gab es für *M. sedula* zwar Mutmaßungen, dass es sich bei einem Protein mit etwa 170 kDa um den S-Layer handeln

könnte, jedoch fehlte dahingehend bisher ein proteinanalytischer Beweis sowie der genetische Hintergrund des Proteins (Huber *et al.*, 1989; Klingl, 2007).

## 5 Adhäsion von Archaeen an anorganischen Oberflächen

In Flüssigkulturen werden Bakterien und Archaeen üblicherweise in Form planktonischer Zellen gezüchtet, ein Zustand, in dem die betreffenden Organismen wohl nur bedingt dem in natürlichen Systemen entsprechen. Hier geht man vielmehr von der Ausbildung größerer Zellverbände und sogenannter Biofilme aus, die sich in vielerlei Hinsicht von planktonischen Zellen unterscheiden (Watnick und Kolter, 1999; 2000). In Biofilmen werden neben Netzwerken aus Zellanhängen extrazelluläre Polysaccharide gebildet, in die die Zellen regelrecht eingebettet sind. Diese schützen sie einerseits gegen physikalische Kräfte wie Strömung und Temperatur und erhöhen andererseits ihre Widerstandskraft gegen Antibiotika (Vu *et al.*, 2009; Flemming und Wingender, 2010).

Bei Archaeen konnten bezüglich einer derartigen Biofilmbildung diverse Beobachtungen gemacht werden. *Pyrococcus furiosus* adhärirt über kabelartige Flagellenbündel an Oberflächen wie Glimmer und Kohle-befilmte Goldnetzchen (Näther *et al.*, 2006); eine direkte Anheftung an Glas war für *P. furiosus* ohne weiteres nicht möglich. Die Inkubation als Cokultur mit *Methanopyrus kandleri* führte jedoch dazu, dass letzterer sich primär am Glas anheftet und *P. furiosus* über Zell-Zell-Kontakte und Flagellen auf *M. kandleri* aufwachsen kann (Schopf *et al.*, 2008).

Für *A. fulgidus* konnte gezeigt werden, dass dieser Organismus einen Biofilm ausbildet, sobald er mit Schwermetallen oder Pentachlorphenol in Kontakt kommt (Lapaglia und Hartzell, 1997).

Unter dem Aspekt der Adhäsion an Oberflächen sind zusätzlich noch einige Vertreter der Spezies *S. solfataricus* zu nennen, zu denen auch der Stamm P2 zählt (Zillig *et al.*, 1980). Generell ist *S. solfataricus* in der Lage, Zellanhänge wie Flagellen und durch Ultraviolettes(UV)-Licht-induzierbare Pili auszubilden (Albers *et al.*, 2006; Albers und Pohlschröder, 2009). Neben dem *S. solfataricus* Stamm P2 ist es seit kurzem möglich, mit Hilfe des genetisch manipulierbaren Stammes PBL2025 durch Geninaktivierung Mutanten herzustellen, von denen zwei im Bezug auf eine Interaktion mit Oberflächen von Bedeutung sind (Schelert *et al.*, 2004). Die Mutante  $\Delta$ flaJ bildet keine Flagellen aus. Ihr fehlt ein integrales Membranprotein FlaJ, welches am Aufbau der Flagelle beteiligt ist (Szabó *et al.*, 2007b). Eine weitere Mutante ist  $\Delta$ upsE, die eine Deletion der ATPase UpsE aufweist, welche an der Assemblierung UV-induzierbarer Pili beteiligt ist. Diese Zellen weisen keine Pili mehr auf und können nach UV-Bestrahlung nicht mehr aggregieren (Fröls *et al.*, 2008). Mit Hilfe dieser Mutanten ist es möglich, vergleichende Studien zur Anheftung von Archaeen

bzw. Mikroorganismen im Allgemeinen an verschiedenen Oberflächen wie Glimmer oder Glas durchzuführen und den Einfluss zellulärer Oberflächenstrukturen zu beurteilen. Gerade im Hinblick auf Pyrit-oxidierende Mikroorganismen sind solche Untersuchungen von Bedeutung: Sowohl für Bakterien wie *A. ferrooxidans*, *A. thiooxidans* und *L. ferrooxidans* als auch für Archaeen wie *A. brierleyi*, *M. sedula* und *S. metallicus* konnte nämlich eine Anheftung an Pyritoberflächen gezeigt werden konnte (Harneit *et al.*, 2006; Mikkelsen *et al.*, 2007). Bei *Acidithiobacillus* wird angenommen, dass die Adhäsion durch das EPS vermittelt wird und dabei die Zusammensetzung des Erzes (Pyrit, Sphalerit, Chalcopyrit, Bleisulfid) eine entscheidende Rolle spielt (Harneit *et al.*, 2006; Sand und Gehrke, 2006). Zusätzlich scheinen bestimmte kristallographische Oberflächenorientierungen bei Pyrit eine Anheftung und die Oxidation zu begünstigen (Ndlovu und Monhemius, 2005).

Obwohl *A. caldus* nicht in der Lage ist, Pyrit direkt zu oxidieren, wurde auch für diese Spezies eine Anheftung an Pyrit, Markasit und Arsenopyrit gezeigt (Edwards *et al.*, 2000). Die Orientierung adhäsiver Zellen entspricht dabei der Ausrichtung der durch die Oxidation hervorgerufenen Ätzgruben. Da *A. caldus* lediglich zur Oxidation von Schwefel und dessen Verbindungen, nicht aber von  $\text{Fe}^{2+}$  fähig ist, scheint die Adhäsion zusätzlich mit Bereichen auf der Erzoberfläche zu korrelieren, die höhere Anteile von Schwefel enthalten (Edwards *et al.*, 2000).

## 6 Zielsetzung

Das Hauptaugenmerk dieser Arbeit lag auf mesophilen, moderat thermophilen und thermophilen Mikroorganismen, welche an der AMD und somit auch an der damit verbundenen Belastung der Umwelt beteiligt sind. Dabei sollten innerhalb der in diesem Kontext bedeutsamen Gattung *Acidithiobacillus* zwei neue stäbchenförmige Stämme, SP5/1 und HV2/2, beschrieben und eingeordnet werden. Das Isolat SP5/1 wurde bislang, aufgrund häufig beobachteter Kurzstäbchen bis hin zu kokkoiden Zellen, unter der Bezeichnung „*Thiobacillus sphaeroides*“ geführt (Huber, 1987). Eine Beschreibung des Isolates HV2/2 fehlte bislang, es wurde jedoch der Gattung *A. ferrooxidans* zugerechnet (Huber H., pers. Mitteilung). Die Charakterisierung der Oberflächenproteine dieser  $\gamma$ -Proteobakterien und mögliche Funktionen jener Strukturen sollten erörtert und weiterführende Informationen zum S-Layer des thermophilen Crenarchaeons *M. sedula* TH2 gesammelt werden. Zusätzlich galt es, die Interaktionen der Pyrit-oxidierenden Mikroorganismen mit Hilfe einer 3-Dimensionalen Rekonstruktion durch Tomographie an Semidünnschnitten von eingebetteten Zellen auf Pyrit an den Beispielen des *Acidithiobacillus*-Isolates SP5/1 und *M. sedula* TH2 darzustellen. Des Weiteren sollte die Adhäsion und Interaktion mit weiteren anorganischen Oberflächen für Pyrit-oxidierende Mikroorganismen untersucht werden. Die Stämme der Gattung

*S. solfataricus*, P2 und PBL2025, sowie die Mutanten  $\Delta$ flaJ und  $\Delta$ upsE des letztgenannten Stammes sollten Spezies-vergleichend dargestellt werden um Aufschluss über den Mechanismus der Anheftung dieser Organismen an Oberflächen zu erlangen.

## II Material und Methoden

### 1 Substanzen und Bezugsquellen

#### 1.1 Chemikalien

Substanz	Bezugsquelle
Acrylamid-Bisacrylamid-Fertiglösung (37,5:1)	Roth, Karlsruhe
Agarose	Biozym, Oldendorf
Alcianblau GS	Serva, Heidelberg
Ammoniumhydroxid	Sigma - Aldrich, Taufkirchen
Ammoniumpersulfat	Serva, Heidelberg
Ammoniumsulfat	Fluka Chemie AG, Buchs (CH)
(D-)Arabinose	Sigma - Aldrich, Taufkirchen
Bleicitrat	Serva, Heidelberg
Bleiglanz (Clausthal)	Krantz, Bonn
Bromphenolblau	Serva, Heidelberg
BSA; Fraktion V	Sigma, St. Louis (USA)
Chalkopyrit (Bad Grund)	Krantz, Bonn
Chalkopyrit (Norwegen)	Eurobrasil Import, München
Coomassie Brilliant Blue R 250	Sigma - Aldrich, Taufkirchen
Coomassie-Reagenz (Roti <sup>®</sup> -Quant)	Roth, Karlsruhe
DAPI	Fluka Chemie AG, Buchs (CH)
DNase II	Roth, Karlsruhe
Dithiothreitol	Sigma - Aldrich, Taufkirchen
EDTA (Dinatriumsalz)	Serva, Heidelberg
Epon <sup>®</sup> 812 Mix	Fluka Chemie AG, Buchs (CH)
Ethanol; p.a.	Baker, Deventer (NL)
Ethidiumbromid	Roth, Karlsruhe
Ferrozin	Sigma - Aldrich, Taufkirchen
Genapol X-080	Fluka Chemie AG, Buchs (CH)
Glutardialdehyd (50 % w / v)	Fluka Chemie AG, Buchs (CH)
Glycerin	Fluka Chemie AG, Buchs (CH)
HF-Pyridin	Sigma - Aldrich, Taufkirchen
Kaliummethylxanthogenat	Fluka Chemie AG, Buchs (CH)

MES	Sigma - Aldrich, Taufkirchen
N,N'-Methylenbisacrylamid	Roth, Karlsruhe
Natriumthiosulfat	Sigma - Aldrich, Taufkirchen
NBT/BCiP-Stock-Solution	Roche, Mannheim
Osmiumtetroxid	Plano, Wetzlar
Periodat	Merck, Darmstadt
Phenol und Phenolgemische	MP Biomedicals, Illkirch (F)
PMSF	Roth, Karlsruhe
2-Propanol; p.a.	Acros, New Jersey (USA)
Pyrit (PK)	Universität Kiel, Institut für Geowissenschaften
Schiff-Reagenz	Roth, Karlsruhe
Schwefel	Riedel-de-Haen, Seelze
SDS (Natriumdodecylsulfat) ultra pure	Serva, Heidelberg
Silbernitrat	Roth, Karlsruhe
Sphalerit	Krantz, Bonn
TEMED	Sigma - Aldrich, Taufkirchen
Trichloressigsäure	Applied Biosystems Ltd., Warrington (GB)
Tricin; p.a.	Roth, Karlsruhe
Tris; p.a.	USB, Cleveland (USA)
Triton-X100	Sigma - Aldrich, Taufkirchen
Trypton	Bacto Laboratories, Mt. Pritchard (Australien)
Uranylacetat	Serva, Heidelberg

**Tabelle 1:** Bezugsquellen der Chemikalien

Chemikalien, die nicht in der Tabelle aufgeführt sind, wurden von der Firma Merck (Darmstadt) in p.a. Qualität bezogen. Die für die Kultivierung der Mikroorganismen benötigten Gase und Gasgemische stammten von der Firma Linde Gas (Nürnberg).

## 1.2 Enzyme und kommerzielle Kits

### Enzyme und kommerzielle Puffer

Enzym/Puffer	Hersteller
Desoxyribonuklease II	Roth, Karlsruhe
Lichrosolv H <sub>2</sub> O	VWR International GmbH, Darmstadt
dNTP-Mix, 25 mM each	Fermentas, St.Leon-Rot
Pure Taq DNA Polymerase	Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen
Pure Taq Reaktionspuffer Y	Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen
Trypsin	Roche, Mannheim

**Tabelle 2:** Bezugsquellen der Enzyme und kommerziellen Puffer

### Reaktions-Kits

Reaktionskit	Hersteller
e.Z.N.A. <sup>TM</sup> Gel Extraktion Kits D2500-01	Omega Bio- Tek, Inc., Norcross, USA
QIAGEN <sup>®</sup> Plasmid Plus Midi Kit (25)	QIAGEN GmbH, Hilden
Wizard <sup>®</sup> Plus Midipreps DNA Purification System	Promega Corporation, Madison, USA

**Tabelle 3:** Bezugsquellen der Reaktions-Kits

## 1.3 Molekularmassenstandards

Protein-Massenstandard	Hersteller
PageRuler <sup>TM</sup> Unstained Protein Ladder; SM0661 (10-200 kDa)	Fermentas, St.Leon-Rot
PageRuler <sup>TM</sup> Prestained Protein Ladder; SM0671 (10-170 kDa)	Fermentas, St.Leon-Rot

**Tabelle 4:** Bezugsquellen der Protein-Massenstandards

DNA-Längenstandard	Hersteller
O'Range Ruler <sup>TM</sup> 100bp-500bp DNA Ladder; SM0653	Fermentas, St.Leon-Rot
GeneRuler <sup>TM</sup> DNA Ladder Mix, ready-to-use	Fermentas, St.Leon-Rot

**Tabelle 5:** Bezugsquellen der DNA-Längenstandards

## 1.4 Antikörper

Primärer Antikörper	Hersteller
rabbit anti-Slp90	Davids Biotechnologie, Burgweinting
rabbit anti-Msed1806	Davids Biotechnologie, Burgweinting
rabbit anti-GroEL	Davids Biotechnologie, Burgweinting
rabbit anti-Omp40	Davids Biotechnologie, Burgweinting

**Tabelle 6:** Bezugsquellen primärer Antikörper

Sekundärer Antikörper	Hersteller
goat anti-rabbit IgG + 6nm Gold	Aurion, Wageningen (NL)
goat anti-rabbi IgG + alkalische Phosphatase	Sigma, Taufkirchen

**Tabelle 7:** Bezugsquellen sekundärer Antikörper

## 1.5 PCR-Primer

Sämtliche in dieser Arbeit verwendeten PCR-Primer wurden von der der Firma Metabion bezogen.

Primer	forward/reverse	Sequenz (5' → 3')
9bF	forward	GRG TTT GAT CCT GGC TCA G
1406uR	reverse	ACG GGC GGT GTG TRC AA
AFE_2303_fw	forward	ATG CAT CGC ACC TTC TTA TTC CTC C
AFE_2303_rev	reverse	TCA ATC GGG TTG CGG CGT GTG
Acaldus_Slp_fw	forward	ATG CGA TTC GTC CCA TCC TAC GCA
Acaldus_Slp_rev	reverse	TCA GTC CTC CCT CAT CGA TGC TGT

**Tabelle 8:** Übersicht über die verwendeten Primer

## 1.6 Verbrauchsmaterialien und Geräte

Verbrauchsmaterialien und Geräte, welche nicht an entsprechender Stelle genannt werden und für die Durchführung der Experimente von Bedeutung sind, wurden in Tabellen im Anhang zusammengefasst (VII.3.2).

## 2 Kulturmedien und Anzucht der Mikroorganismen

Die Kultivierung der *Acidithiobacillus*-Stämme sowie *Thiobacillus azoricus* HW3 erfolgte in 9k-Medium unter aeroben Bedingungen. Abweichend hiervon setzte man für *Thiobacillus prosperus* LM3 und *Thiomonas cuprina* Hö5 M1-Medium mit unterschiedlichen pH-Werten und für *Thiobacillus plumbophilus* Gro7 Allen-I-Medium ein. Bei der Anzucht von *M. sedula* TH2 und *S. metallicus* Kra23 wurde modifiziertes Allen-Medium (MAL), für *S. solfataricus* Brock-Medium, ebenfalls unter aeroben Bedingungen, verwendet.

### 2.1 Zusammensetzung der Medien

#### 2.1.1 9k-Medium (Silverman und Lundgren, 1959)

Substanz	Menge
KCl	0.1 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> x 3 H <sub>2</sub> O	0.65 g
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	3 g
MgSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O	0.5 g
Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> x 4 H <sub>2</sub> O	0.01 g
H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub>	ad 1000.0 ml

Der pH-Wert wurde mit 50%iger H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> auf 2.5 eingestellt. Für Stickstoff-freies Medium wurde Ammoniumsulfat durch Kaliumsulfat (3.96 g) ersetzt. Um die Fähigkeit zu anaeroben Wachstum überprüfen zu können, wurden dem Medium 2.5 g Fe<sub>2</sub>(SO<sub>4</sub>)<sub>3</sub> oder FeCl<sub>3</sub> als Elektronenakzeptor zugesetzt, der pH-Wert auf 2.0 eingestellt und der Sauerstoff, wie unter II.2.2.1 beschrieben, weitestgehend entfernt. Die Elektronenquelle war in diesem Fall Wasserstoff.

## 2.1.2 MAL-Medium

Allen-Medium (Allen, 1959), modifiziert nach Brock (Brock *et al.*, 1972)

Substanz	Konzentration	Menge
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$		1.3 g
$\text{MgSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$		250 mg
$\text{KH}_2\text{PO}_4$		95 mg
$\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$		70 mg
Stammlösungen:		
$\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \times 10 \text{H}_2\text{O}$	10 mg/ml	450 $\mu\text{l}$
$\text{ZnSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$	10 mg/ml	22 $\mu\text{l}$
$\text{CuCl}_2 \times 2 \text{H}_2\text{O}$	1 mg/ml	50 $\mu\text{l}$
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$	1 mg/ml	30 $\mu\text{l}$
$\text{CoSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$	1 mg/ml	10 $\mu\text{l}$
$\text{KAl}(\text{SO}_4)_2 \times 12 \text{H}_2\text{O}$	10 mg/ml	175 $\mu\text{l}$
$\text{FeCl}_3 \times 6 \text{H}_2\text{O}$	40 mg/ml	500 $\mu\text{l}$
$\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$		ad 1000.0 ml

Der pH-Wert wurde mit 50%iger  $\text{H}_2\text{SO}_4$  auf 2.5 eingestellt.

## 2.1.3 M1-Medium

M1-Medium nach Huber *et al.* (1986) und Huber und Stetter (1990).

Substanz	Menge
KCl	0.33 g
$\text{MgCl}_2 \times 6 \text{H}_2\text{O}$	2.75 g
$\text{MgSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$	3.45 g
$\text{NH}_4\text{Cl}$	1.25 g
$\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$	0.14 g
$\text{K}_2\text{HPO}_4 \times 3 \text{H}_2\text{O}$	0.18 g
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	0.14 g

NaCl	0.5 g
Wolfe`s Mineralien 10x/pH 1.0/ neu -T	1.0 ml
H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub>	ad 1000.0 ml

Der pH-Wert des M1-Mediums wurde mit 50%iger H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> auf 2.5 bzw. 3.5 eingestellt. Die Zusammensetzung von Wolfe`s Mineralien findet sich im Anhang (Abschnitt VII.3.4).

#### 2.1.4 Allen-I-Medium

Allen-I-Medium nach Drobner *et al.* (1992).

<b>Substanz</b>	<b>Menge</b>
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	1.3 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	280 mg
MgSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O	250 mg
CaCl <sub>2</sub> x 2H <sub>2</sub> O	70 mg
FeCl <sub>3</sub> x 6 H <sub>2</sub> O	20 mg
Stammlösungen: 100 mg/100 ml (w/v)	
MnCl <sub>2</sub> x 4 H <sub>2</sub> O	1.8 ml
Na <sub>2</sub> B <sub>4</sub> O <sub>7</sub> x 10 H <sub>2</sub> O	4.5 ml
ZnSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O	220 µl
CuCl <sub>2</sub> x 2 H <sub>2</sub> O	50 µl
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> x 2 H <sub>2</sub> O	30 µl
VO <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> x 5 H <sub>2</sub> O	30 µl
CoSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O	10 µl
H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub>	ad 1000.0 ml

Der pH-Wert des Allen-I-Mediums wurde mit 50%iger H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> auf 3.5 eingestellt.

### 2.1.5 Brock-Medium

Das Medium wurde entsprechend der Anweisungen in Brock *et al.* (1972) hergestellt und der pH-Wert mit 50%iger H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> auf 3.0 eingestellt. Als Substrat diente 0.1 % Trypton (w/v). Zur Induktion der mutierten Stämme von *S. solfataricus* PBL2025 wurde 0.2 % D-Arabinose zugesetzt.

## 2.2 Herstellung der Kulturmedien

### 2.2.1 Labormaßstab – Serumflaschen und Erlenmeyerkolben

Hergestellt wurden die Medien entsprechend der Zusammensetzung unter II.2.1. Aerobes 9k-Medium, M1-Medium und Allen-I-Medium wurde zu je 30 ml in 100 ml-Erlenmeyerkolben beziehungsweise zu je 100 ml in 500 ml Erlenmeyerkolben abgefüllt und mit Aluminiumfolie verschlossen. Anaerobes 9k-Medium, MAL-Medium und Brock-Medium wurde zu je 20 ml in Serumflaschen (Glastyp III, Bormioli, Italien) bzw. zu je 100 ml in 500 ml-Sovirell-Flaschen abgefüllt, mit Gummistopfen (DIN 12871, Laborcenter Nürnberg) verschlossen und mit Aluminiumkappen (Aluminium seal stopper, Belco Glas, New Jersey, USA) oder Schraubverschlüssen gesichert.

Für die Herstellung anaeroben (mikroaeroben) 9k-Mediums wurde dieses, wie in Burghardt (2008) beschrieben für 30 Min. mit Stickstoff durchgast, in der Anaerobenkammer (COY Laboratory Products Inc., Ann Arbor (USA)) in Serumflaschen abgefüllt und im Anschluss die Kammer-Gasphase (N<sub>2</sub>/H<sub>2</sub> 95:5 v/v) gegen ein Gemisch von H<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub> 80:20 (v/v) an der Gasstation ausgetauscht. Hierbei wurde dreimal abwechselnd evakuiert und anschließend 2 bar der Gasphase auf die Serumflaschen aufgespresst.

### 2.2.2 Großtechnische Anzucht im Fermenter

Die Großtechnische Anzucht des *Acidithiobacillus*-Stammes SP5/1 und von *M. sedula* TH2 erfolgte in einem emailierten 50 L Fermenter. Als Substrat dienten jeweils 125 g Pyrit.

### 2.2.3 Bestimmung der optimalen Wachstumstemperatur und des pH-Wertes

Um die optimalen Wachstumstemperatur der *Acidithiobacillus*-Stämme SP5/1 und HV2/2 zu bestimmen, wurden die Organismen über einen Zeitraum von mindestens 11 Tagen inkubiert, die Zellzahlen mikroskopisch entsprechend II.5.1.2 ermittelt und in Abhängigkeit von der Inkubationsdauer halblogarithmisch aufgetragen. Aus diesem Diagramm ließ sich anhand der maximalen Steigung die minimale Verdopplungszeit bei jeder Temperatur

bestimmen. Die Inkubation des Stammes HV2/2 erfolgte mit 1 % Schwefel und 0.1 % Trypton (jeweils Endkonzentration w/v) in dreifacher Ausfertigung bei folgenden Temperaturen: 20 °C, 30 °C, 32 °C, 37 °C, 40 °C, 45 °C, 47 °C, 50 °C und 60 °C. Das pH-Spektrum wurde in Schritten von 0.5 zwischen pH 0.5 und 5.0 bei 45 °C mit 1 % S<sup>0</sup> ermittelt. Für das Isolat SP5/1 erfolgte die Bestimmung des Temperaturbereichs bei (15 °C, 20 °C, 25 °C, 30 °C, 37 °C und 41 °C auf der Erzmischung G1) wie auch des pH-Spektrums durch Harald Huber (1987).

#### 2.2.4 Ermittlung des Substratspektrums

Zur Bestimmung möglicher Substrate der Isolate SP5/1 und HV2/2 wurden sowohl Verbindungen getestet, die für Vertreter der Gattung *Acidithiobacillus* beschrieben sind (Temple und Kolmer, 1951; Waksman und Jaffe, 1922; Huber *et al.*, 1986; Huber, 1987; Hallberg und Linström, 1994; Hallberg *et al.*, 2010) als auch gezielt solche, die typisch für die Spezies *A. caldus* sind (Hallberg und Lindström, 1994). Die Inkubation erfolgte in drei parallelen Ansätzen bei 28 °C (<sup>a</sup> Stamm SP5/1) bzw. 37 °C (<sup>b</sup> Stamm HV2/2) mit den folgenden Substraten. Experimente, die bereits in Huber (1987) durchgeführt wurden, sind mit \* entsprechend gekennzeichnet:

Schwefel<sup>a,b</sup> (1 % w/v), Schwefel und Trypton<sup>b</sup> (1 % w/v), Schwefel und Hefeextrakt<sup>b</sup> (1 % und 0.1 % w/v), Schwefel und Glukose<sup>b</sup> (1 % und 0.1 % w/v), Pyrit<sup>a,b</sup> (0.5 g), Erzmischung G1<sup>a,b</sup> (1.0 g), Erzmischung G1N<sup>a,b</sup> (1.0 g), Erzmischung G6<sup>a,b</sup> (1.0 g), FeSO<sub>4</sub><sup>a,b</sup> (0.1 % w/v), „Knallgas“<sup>a,b</sup> (1 bar H<sub>2</sub> auf einer Gasphase mit N<sub>2</sub>/O<sub>2</sub> 80:20, 250 kPa, aerob), K<sub>2</sub>S<sub>4</sub>O<sub>6</sub> und Hefeextrakt<sup>b</sup> (0.5 % und 0.1 % w/v), K<sub>2</sub>S<sub>4</sub>O<sub>6</sub> und Glukose<sup>b</sup> (0.5 % und 0.1 % w/v), Glukose<sup>b</sup> (0.1 % w/v), Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub><sup>a,b,\*</sup> (20 mM), Na<sub>2</sub>S<sup>a,b</sup> (0.1 % und 1.0 % w/v), Hefeextrakt<sup>a,b,\*</sup> (1 % w/v) und Trypton<sup>b</sup> (1 % w/v).

#### 2.2.5 Anaerobes Wachstum und Stickstofffixierung

Um die Fähigkeit der beiden Isolate HV2/2 und SP5/1 zu anaeroben Wachstum zu testen, wurde den Medien der Sauerstoff entzogen (entsprechend II.2.2.1), wobei H<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub> (80:20, 250 kPa) als Gasphase diente und somit der darin enthaltene Wasserstoff als Elektronendonator, als Elektronenakzeptor wurde 0.25 % (w/v) FeCl<sub>3</sub> zugesetzt (Ohmura *et al.*, 2002).

Die Fähigkeit zur Fixierung atmosphärischen Stickstoffs ließ sich ermitteln, indem man Stickstoff-freies 9k-Medium herstellte. Hierfür wurde (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> durch eine äquimolare Menge an K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> ersetzt.

### 3 Sterilisation

Lösungen sowie die abgefüllten Anzuchtmedien wurden für 20 min bei 121 °C und 2 bar unter feuchter Hitze in einem SANOclav Tischautoklaven (Wolf, Bad Überkingen-Hausen), Schwefelhaltiges Medium bei 110 °C für 60 min sterilisiert. Sämtliche im weiteren Verlauf genannten und autoklavierbaren Materialien wie Einmalpipettenspitzen, Spritzen, Kanülen und ähnliches wurden für 40 min bei 121 °C und 2 bar autoklaviert. Materialien, welche für die Adhäsionsexperimente der Mikroorganismen Verwendung fanden, wurden dem Medium bereits vor dem Autoklavieren zugegeben. Erze und Erzmischungen (G1, G1N, G6) wurden auf die gewünschte Korngröße in der Kugelmühle gemahlen und anschließend auf Partikeldurchmesser unter 1 mm bzw. 12 µm (Pyrit) durch ein Sieb homogenisiert (Huber, 1987). Um Schwefelrückstände von gemahlene Erzpartikeln zu entfernen, wurden diese dreimal mit verdünnter Salzsäure und  $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$  gewaschen und anschließend in Portionen von 0.5 g (Pyrit ( $\text{FeS}_2$ ), Sphalerit ( $\text{ZnS}$ ), Chalcopyrit ( $\text{CuFeS}_2$ ), Bleisulfid ( $\text{PbS}$ )) oder 1.0 g (G1, G1N, G6) in Reagenzgläser abgewogen, mit Aluminiumdeckeln verschlossen und zur Sterilisation über Nacht im Trockenschrank bei 140 °C inkubiert. Die Herkunftsorte bzw. Bezugsquellen der jeweiligen Erze finden sich in Tabelle 1 (Abschnitt II.1.1).

## 4 Verwendete Organismen und Inkubationsbedingungen

### 4.1 Stämme

Kultur/Stamm	Medium	Temperatur	Substrat (Standard)
<i>Acidithiobacillus</i> -Isolat SP5/1	9k-Medium	28 °C	0.5 g Pyrit
<i>Acidithiobacillus</i> -Isolat ΔSlp90	9k-Medium	28 °C	0.5 g Pyrit
<i>Acidithiobacillus</i> -Isolat HV2/2	9k-Medium	45 °C	0.5 g Pyrit
<i>Metallosphaera sedula</i> TH2 <sup>T</sup>	MAL-Medium	75 °C	0.5 g Pyrit
<i>Sulfolobus metallicus</i> Kra23 <sup>T</sup>	MAL-Medium	65 °C	0.5 g Pyrit
<i>Acidithiobacillus ferrooxidans</i> DSM 14882 <sup>T</sup>	9k-Medium	28 °C	1 g G1N
<i>Acidithiobacillus thiooxidans</i> DSM14887 <sup>T</sup>	9k-Medium	30 °C	1 % Schwefel
<i>Thiobacillus azoricus</i> HW3	9k-Medium	30 °C	1 g G1N
<i>Thiobacillus prosperus</i> LM3 <sup>T</sup>	M1-Medium pH 2.5	37 °C	1 g G1N
<i>Thiobacillus plumbophilus</i> Gro7	Allen-I-Medium	28 °C	0.5 g PbS
<i>Thiomonas cuprina</i> Hö5 <sup>T</sup>	M1-Medium pH 3.5	37 °C	1 % Schwefel
<i>Sulfolobus solfataricus</i> PBL2025	Brock-Medium	78 °C	0.1 % Trypton
<i>Sulfolobus solfataricus</i> ΔflaJ	Brock-Medium	78 °C	0.1 % Trypton 0.2 % D-Arabinose
<i>Sulfolobus solfataricus</i> ΔupsE	Brock-Medium	78 °C	0.1 % Trypton 0.2 % D-Arabinose
<i>Sulfolobus solfataricus</i> P2	Brock-Medium	78 °C	0.1 % Trypton

**Tabelle 9:** Verwendete Stämme inklusive der entsprechenden Medien, Wachstumstemperaturen und Substrate. Weiterführende Informationen sind in Tabelle 31 zusammengefasst (VII.3.1).

### 4.2 Inkubationsbedingungen

Die Serumflaschen und Erlenmeyerkolben wurden mit Hilfe einer 1 ml Kunststoffspritze (Ersta, Asik, Dänemark) mit Einmal-Kanülen (Terumo Europe N.V., Leuven, Belgien) mit 1 % (v/v) einer frischen Kultur angeimpft. Als Inokulum für den 50-Liter-Fermenter dienten 500 ml (ebenfalls 1 % v/v) einer logarithmischen Kultur. Die Proben wurden schüttelnd im Wasserbad (Erlenmeyerkolben) oder in Schüttelinkubatoren (Serumflaschen) inkubiert. Fermenter wurden mit 150 Umdrehungen pro Minute gerührt.

## 5 Mikroskopie

### 5.1 Phasenkontrast- und Fluoreszenzmikroskopie

#### 5.1.1 Lichtmikroskopie

Zur Bestimmung der Zellzahlen, zur Kontrolle des Wachstums und der Morphologie wurde ein Phasenkontrastmikroskop Olympus BX 60 in Verbindung mit einem Ölimmersionsobjektiv (100x/1.25; Nikon) und drei Luftobjektiven (5x/0.12; 10x/0.25; 40x/0.65; jeweils Nikon) verwendet.

#### 5.1.2 Bestimmung der Zellzahlen

Zum Erstellen von Wachstumskurven und die Bestimmung der Gesamtzellzahl wurde eine Thoma-Zählkammer (Kammervolumen: 0.02 mm x 0.0025 mm<sup>2</sup> pro Kleinstquadrat) verwendet, wobei jeweils 4 Kleinstquadrate ausgezählt wurden. Damit konnte die Zellzahl pro ml nach folgender Formel berechnet werden.

$$\text{Gesamtzellzahl / ml} = \left( \frac{\text{Anzahl der Zellen}}{\text{Anzahl der ausgezählten Kleinstquadrate}} \right) \times 2 \times 10^7$$

#### 5.1.3 Fluoreszenzfärbung mit DAPI

Fluoreszenzaufnahmen DAPI-gefärbter Zellen (Teiner, 1995) wurden an einem Phasenkontrastmikroskop Olympus BX 60 mit UV-Ausstattung durchgeführt. Zur Anregung der Zellen wurde ein spezieller Filter der Bezeichnung U-MNU2 (AHF Analysetechnik AG, Tübingen) mit den folgenden Spezifikationen verwendet: Anregungswellenlänge 360 – 370 nm, Teilerspiegel DM 400, Emissionsfilter Sperr ± 420. Um die Zellen mit DAPI anzufärben, wurde 1 µl DAPI-Stammlösung mit einem Tropfen einer gut bewachsenen Kultur auf einen Glasobjektträger gemischt und mit einem Deckgläschen abgeschlossen.

<u>DAPI-Stammlösung</u>	Na-Acetat, pH 4.75	2.0 M
	Na <sub>2</sub> EDTA	0.1 M
	DAPI	0.2 mg/ml
	SDS	1 % (w/v)
	ad H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub>	

## 5.2 Transmissionselektronenmikroskopie

Transmissionselektronenmikroskopischen Untersuchungen im Rahmen dieser Arbeit wurden an einem Philips CM 12 Transmissionselektronenmikroskop (TEM; FEI Co., Eindhoven, NL) ausgeführt. Die Beschleunigungsspannung der Elektronen, welche aus einer Lab<sub>6</sub>-Kathode ausgeheizt werden betrug an diesem Gerät 120 kV. Zur Aufzeichnung digitaler Bilder verfügte das TEM über eine Slow-Scan-CCD-Kamera TEM 1000 (Tietz Video & Image Processing Systems GmbH, Gauting); die Ansteuerung erfolgte mit Hilfe des Microsoft Programms EMMENU (Version 4; Tietz Video & Image Processing Systems GmbH, Gauting).

### 5.2.1 Herstellung von Suspensionspräparaten und Kontrastierung

Zellen in Suspension mussten zunächst für die Herstellung von Suspensionspräparaten mit Glutardialdehyd (Endkonzentration 1.25 %) für 15 min chemisch fixiert werden. Anschließend wurden die Zellsuspensionen durch Zentrifugation in einer Eppendorf Tischzentrifuge (Typ 5417 C, Eppendorf AG, Hamburg) für 10 min bei 20000 x g aufkonzentriert. Das so gewonnene Pellet wurde in 20 bis 50 µl Restmedium resuspendiert. Derartige Suspensionen bzw. auch Proteinlösungen, beispielsweise aus einer S-Layer Präparation, werden auf Kohle-befilmte und beglimmte Kupfernetzchen (400 square mesh; Plano GmbH, Wetzlar) gegeben. Zum Beglimmen und gleichzeitigen Sterilisieren bediente man sich eines Harrick Plasma Cleaner/Sterilizer (PDC-3xG). Die überschüssige Flüssigkeit auf den Kupfernetzchen wurde auf ein Filterpapier geblotet, das Netzchen anschließend zwei- bis dreimal auf einem Tropfen H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub> zur Entfernung von Medienbestandteilen und Salzen gewaschen und dazwischen jeweils auf ein Filterpapier geblotet. Nach dem letzten Waschschrift wurden die Netzchen für 20 bis 30 sec auf einem Tropfen essigsäuren Uranylacetat (2 % w/v) inkubiert, um den Kontrast der Proben für die Elektronenmikroskopie zu erhöhen. Alternativ wurden die Proben nach dem letzten Waschschrift getrocknet und anschließend in einer Hochvakuum-Bedampfungs- und Gefrierätzanlage (CFE 50; Cressington Ltd., Watford, UK) mit 1 nm Platin/Kohle unter einem Winkel von 15 ° schräg bedampft.

### 5.2.2 Gefrierbruch und Gefrierätzung

Wie für die Herstellung von Suspensionspräparation bereits beschrieben, wurden auch bei dieser Präparationstechnik die Zellen durch Zentrifugation, allerdings ohne eine vorherige chemische Fixierung, aufkonzentriert (entsprechend II.5.2.1). Das gewonnene Pellet wurde mit der restlichen Flüssigkeit aufgenommen, wobei das Volumen so gering wie möglich

gehalten wurde. Hiervon wurden 1.7  $\mu\text{l}$  auf einen Goldträger (Bal-Tec, Witten, Ruhr) gegeben und durch Eintauchen in flüssigen Stickstoff ( $\text{LN}_2$ ) bei  $-196\text{ }^\circ\text{C}$  kryofixiert. Der Goldträger wurde in  $\text{LN}_2$  auf dem Präparathalter montiert und in die Hochvakuum-Bedampfungs- und Gefrierätzanlage (CFE 50; Cressington Ltd., Watford, UK) eingeschleust, welche im Vorfeld mit  $\text{LN}_2$  auf mindestens  $-170\text{ }^\circ\text{C}$  vorgekühlt wurde. Der Probenhalter wurde daraufhin auf  $-97\text{ }^\circ\text{C}$  erwärmt. Um den Temperatenausgleich auch in der Probe zu gewährleisten, wurde nach Erreichen der Temperatur für mindestens 7 min abgewartet, bevor die gefrorene Probe mit einem auf  $-180\text{ }^\circ\text{C}$  gekühlten Messer gebrochen und das Oberflächenwasser mit einem ebenfalls gekühlten Kupferblock für 3.5 - 4 min ab sublimiert wurde. Um den Kontrast des Präparats zu erhöhen, wurde 1 nm Platin/Kohle unter einem Winkel von  $45\text{ }^\circ$  und zur Stabilisierung eines so gewonnenen Oberflächenabdrucks (Replika) 10 nm Kohle senkrecht aufgedampft. Die Platin-Kohle-Replika wurde nach dem Ausschleusen aus der Bedampfungsanlage zur Entfernung von Zellresten auf Schwefelsäure (70 % v/v) abflottiert und über Nacht für mindestens 12 h inkubiert. Durch zweimaliges Überführen der Replika auf  $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$  für jeweils 30 min mit Hilfe einer Platinöse wurde die Schwefelsäure entfernt. Schließlich wurden die Replika auf unbefilmte aber beglimmte hexagonale Kupfernetzchen (G700HEX, Plano GmbH, Wetzlar) aufgenommen und luftgetrocknet.

### 5.2.3 Hochdruckgefrieren von Mikroorganismen

Ziel des Hochdruckgefrierens von Mikroorganismen war es, die Strukturhaltung der Zellen im Vorfeld einer Gefriersubstitution und Einbettung in ein Kunstharz zur Anfertigung von Ultradünnschnitten zu optimieren. Im Gegensatz zu einer chemischen Fixierung mit Hilfe von Glutardialdehyd oder Formaldehyd werden die Proteine bei dieser Methode ähnlich der Gefrierätzmethode (II.5.2.2) kryofixiert. Durch die hohen Abkühlraten um 20000 K/s in Verbindung mit einem Druck von 1960 bis 2000 bar bei der Verwendung der Hochdruckgefrieranlage EM Pact 2 (Leica Microsystems GmbH, Wetzlar) tritt eine Vitrifizierung des zellulären Wassers auf. Dadurch wird eine Eiskristallbildung und die damit verbundene Umverteilung, Denaturierung oder Aggregation von Zellbestandteilen wie Proteinen und Lipiden vermieden.

#### 5.2.3.1 Hochdruckgefrieren

Im Vorfeld des Hochdruckgefrierens wurden die Zellen möglichst schonend durch Zentrifugation mit geringer Umdrehungszahl aufkonzentriert. Aus den hieraus resultierenden Zellsuspensionen wurden 1.4  $\mu\text{l}$  auf Goldträger mit 200  $\mu\text{m}$  Tiefe (Leica Microsystems GmbH, Wetzlar) pipettiert. Dieser Träger wurde dann in den dafür vorgesehenen

Präparathalter eingeschraubt und in die EM Pact 2 eingeführt. Nach dem Fixieren des Präparathalters wurde der Gefriervorgang ausgelöst, die Goldträger mit den kryofixierten Zellen im Anschluss daran bis zur Weiterbearbeitung in flüssigem Stickstoff (LN<sub>2</sub>) gelagert und die Verlaufskurve von Temperatur und Druck während des Hochdruckgefrierens gespeichert.

### 5.2.3.2 Gefriersubstitution

Die Gefriersubstitution dient dazu, das Wasser in den Zellen bzw. in Geweben durch ein Solvens zu ersetzen, welches seinerseits mit dem Einbettungsharz wie Epon oder vergleichbaren Metacrylaten mischbar ist. Zusätzlich zu der Kryofixierung werden die Zellbestandteile in diesem Schritt durch Glutardialdehyd und Formaldehyd chemisch fixiert und durch die Zugabe geringer Mengen eines Schwermetallsalzes sowohl fixiert als auch kontrastiert. Bei der Gefriersubstitution werden die Proben schrittweise über einen Zeitraum von 24 bis 72h auf Raumtemperatur erwärmt und währenddessen sukzessive durch die Substitutionslösung dehydratisiert. Wie bereits in früheren Arbeiten erwähnt, war es insbesondere bei der Präparation von Mikroorganismen von Vorteil, wenn auch diese Lösung geringe Mengen Wasser enthält (Walther und Ziegler, 2000). Als Substitutionslösung wurde im Rahmen dieser Arbeit ausschließlich ein Gemisch aus Ethanol, Glutaraldehyd, Formaldehyd und Uranylacetat (E.G.F.U.) der folgenden Zusammensetzung verwendet. Das darin aufgelistete Wasser ist dabei bereits in der Glutardialdehydlösung (25 % w/v) und dem frisch hergestellten Formaldehyd enthalten.

Bestandteil	Anteil	Vol. bzw. Masse
Ethanol, p. a.	94.6 % (v/v)	9.5 ml
Uranylacetat	0.5 % (w/v)	50 mg
Glutardialdehyd	0.5 % (w/v)	50 mg
Formaldehyd	1 % (w/v)	100 mg
H <sub>2</sub> O <sub>Millipore</sub>	5.4 % (v/v)	0.7 ml

**Tabelle 10:** Zusammensetzung der Substitutionslösung E.G.F.U.

Aufgrund der Instabilität von gelöstem Formaldehyd stellte man dieses jeweils frisch aus Paraformaldehyd her. Dazu wurden 2 g in 7 ml H<sub>2</sub>O<sub>millipore</sub> gegeben, langsam unter Rühren auf 60 °C erhitzt und solange 1 M Natronlauge zugegeben, bis eine klare Lösung vorlag. Nach dem Neutralisieren mit verdünnter Salzsäure wurde die Lösung mit H<sub>2</sub>O<sub>millipore</sub> auf 10 ml

aufgefüllt und 500 µl (entsprechend 100 mg Formaldehyd) der Substitutionslösung zugegeben.

In diesem Zustand ist die Substitutionslösung für einige Tage haltbar und kann bei -80 °C gelagert werden. Erst kurz vor dem Beginn der Substitution wurde die Lösung in die auf -140°C vorgekühlte Gefriersubstitutionsanlage EM AFS 2 (Leica Microsystems GmbH, Wetzlar) gestellt.

Um nun die hochdruckgefrorenen Proben zu entwässern wurden die Goldträger, welche bis zu diesem Zeitpunkt in LN<sub>2</sub> gelagert wurden, in die EM AFS 2 überführt und in die dafür vorgesehenen Plastikgefäße (Reagentienwanne mit Durchflussringeinsatz, Leica Microsystems GmbH, Wetzlar) mit der Probenseite nach oben in die Vertiefungen eingelegt. Diese Gefäße wurden daraufhin mit der Substitutionslösung aufgefüllt und das automatische Programm gestartet, welches die Temperatur in den folgenden Schritten auf 0 °C erhöhte.

Schritt	Starttemperatur	Endtemperatur	Zeit	Anstieg
1	-90 °C	-90 °C	46.5 h	0 °C/h
2	-90 °C	-60 °C	1 h	30 °C/h
3	-60 °C	-60 °C	8 h	0 °C/h
4	-60 °C	-30 °C	1 h	30 °C/h
5	-30 °C	-30 °C	8 h	0 °C/h
6	-30 °C	0 °C	1 h	30 °C/h
7	0 °C	0 °C	3 h	0 °C/h

**Tabelle 11:** Automatisches Gefriersubstitutionsprogramm der EM AFS 2.

### 5.2.3.3 Infiltration und Einbettung in Epon<sup>®</sup> 812

Als Einbettungsmittel wurde Epon<sup>®</sup> 812 verwendet, welches nach folgender Zusammensetzung hergestellt wurde. Alle Komponenten (außer DMP-30) werden in einem passenden Glasgefäß unter leichtem Rühren für 30 min gemischt, anschließend wird DMP-30 hinzugefügt und für weitere 30 min gerührt.

Epoxy-Einbettungsmittel	46 % (v/v)
DDSA	28.5 % (v/v)
MNA	25.3 % (w/v)
DMP-30	0.2 % (w/v)

Nach dem Ende der Gefriersubstitution (II.2.3.2) wurden die Reagentienwannen mit den darin befindlichen Proben aus der EM AFS 2 entnommen und auf Eis gestellt. Mit Hilfe einer Spritze wurde die Substitutionslösung abgesaugt und die Proben dreimal mit eiskaltem Aceton (100 %) gewaschen. Anschließend gab man ein Epon-Aceton-Gemisch (Verhältnis 1:1) auf die Proben und ließ sie für 2 h auf Eis inkubieren. Danach wurde diese Lösung durch ein Epon-Aceton-Gemisch vom Verhältnis 2:1 ersetzt und die Proben über Nacht bei Raumtemperatur im Abzug gelagert. Hierbei verdampfte das Aceton und die Epon-Konzentration erhöhte sich kontinuierlich. Am Folgetag wurde das alte Epon durch frisch zubereitetes ersetzt und das Harz für 72 h bei 60 °C im Wärmeschrank ausgehärtet.

#### 5.2.3.4 Anfertigen von Ultradünnschnitten

Nachunter 5.2.3.3 beschriebener Einbettung der Proben und vollständiger Auspolymerisierung wurden die Goldträger, welche sich an einem Ende des Zylinders befanden und die Zellen bedeckte, durch sukzessives Eintauchen in LN<sub>2</sub> und Erwärmen auf einer Heizplatte abgesprengt. Anschließend wurde der Eponblock in einen Ultramikrotomiehalter eingespannt und die zu schneidende Fläche mit Hilfe einer Rasierklinge Pyramiden-förmig angetrimmt. Die Ultradünnschnitte wurden in einem Ultracut E Ultramikrotom (Reichert-Jung, Wien) in Kombination mit einem Diamantmesser (Messerwinkel 45°; Diatome, Biel, CH) angefertigt, welches etwa eine Stunde vor dem Schneiden mit H<sub>2</sub>O<sub>millipore</sub> gewässert wurde. Direkt vor dem Schneiden wurde überschüssiges Wasser mit Hilfe einer Spritze soweit abgezogen, dass sich eine ebene Fläche bildete, auf der die Dünnschnitte aufschwimmen konnten. Die Klinge wurde parallel zur Probenoberfläche ausgerichtet, der Vorschub auf 50 nm und die Schnittgeschwindigkeit auf 1 mm/sec eingestellt. Die Kontrolle des Schneidevorgangs erfolgte mit Hilfe eines Binokulars und die Schnittdicke konnte anhand der Farbe der Schnitte durch das reflektierte Licht abgeschätzt werden. Ultradünnschnitte, deren Dicke im Bereich von 50 bis 70 nm liegt, erscheinen dabei silbrig-grau, Semi-Dünnschnitte, welche eine Dicke von etwa 200 nm aufweisen, blau-violett. Die einzelnen Schnitte bzw. Schnittserien wurden auf unbefilmte, beglimmte Nickelgrids (400 square mesh, Plano GmbH, Wetzlar) aufgenommen, überschüssiges Wasser mit einem Filterpapier abgezogen und die Grids an der Luft getrocknet.

### 5.2.3.5 Positiv-Kontrastierung von Ultradünnschnitten

Zur Erhöhung des Kontrastes von Ultradünnschnitten wurden diese zunächst zweimal mit einem Tropfen  $\text{H}_2\text{O}_{\text{millipore}}$  gewaschen und anschließend für 20 min mit der Probenseite nach unten auf einem Tropfen essigsaurer, 2%iger Uranylacetat-Lösung (w/v) inkubiert. Es folgten drei weitere Waschschrte mit  $\text{H}_2\text{O}_{\text{millipore}}$  und eine einminütige Inkubation auf einem Tropfen einer 0.5%igen Bleicitratlösung (w/v). Nach diesem Schritt wurden die Schnitte erneut dreimal mit einem Tropfen  $\text{H}_2\text{O}_{\text{millipore}}$  gewaschen und nach dem Entfernen der überschüssigen Flüssigkeit auf einem Filterpapier luftgetrocknet.

<u>Bleicitrat-Lösung</u>	$\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$	80 mM
	Natriumcitrat	100 mM
	NaOH (1 M, $\text{CO}_2$ -frei)	16 % (v/v)
	Mit $\text{CO}_2$ -freiem Wasser auffüllen	
	pH 11.5 mit 1 M NaOH einstellen	

### 5.2.4 Tomographie

Sämtliche Elektronen-Tomographien im Rahmen dieser Arbeit wurden an Semi-Dünnschnitten mit Dicken von etwa 200 nm durchgeführt. Vor der Aufzeichnung einer Kippserie war es nötig, Referenzmarker auf der Oberfläche der Schnitte bzw. Grids in Form einer kolloidalen Goldlösung (Durchmesser Goldpartikel: 15 nm) zu applizieren. Dazu wurden die Grids mit den darauf befindlichen Schnitten im Plasma Cleaner/Sterilizer hydrophilisiert (s.a. II.5.2.1) und auf einem Tropfen Goldlösung für 30 Sekunden inkubiert, welche man anschließend mit einem Filterpapier absaugte und das Grid lufttrocknete. Für die Aufzeichnung von Kippserien wurde am TEM auf den ‚Stereo‘-Modus gewechselt und nach einer geeigneten Zelle oder Stelle auf dem Präparat gesucht. Durch die Verwendung des Standardpräparathalters war der Kippwinkel-Bereich auf  $-60^\circ$  bis  $+60^\circ$  begrenzt. Dabei wurde zunächst zum maximal negativen Winkel gekippt und Dateien bei den jeweiligen Kippwinkeln im EM-Menü 4.0 als TIFF-Bilder mit 16 Bit aufgezeichnet, bis der maximal positive Winkel erreicht war. Die jeweiligen Winkel wurden bei jeder Bilddatei unter ‚Tilt‘ in den Header geschrieben und erneut gespeichert. Die Winkeleinstellungen entsprechen dabei dem Schema nach Saxton *et al.* (1984). Eine Tabelle der möglichen Kippwinkel findet sich unter VII.3.3 (Tilt-Serie 1). Bei höheren Winkeln verkleinert sich hierbei das Kipp-inkrement, im Fourier-Raum bleibt die Linearität jedoch erhalten. Um die Bilder mit dem Softwarepaket TOM Toolbox (Nickell *et al.*, 2005) weiter bearbeiten zu können, mussten die Daten im EM-

Format exportiert werden. Bei der Verwendung des Programms IMOD (Kremer *et al.*, 1996; Mastronarde, 2006) wurden die Bilder mit Hilfe des Programms ImageJ 1.43u (Wayne Rasband, National Institutes of Health, USA) als MRC-Dateien abgespeichert. Hier war zusätzlich eine Text-Datei mit den verwendeten Kippwinkeln, abgespeichert als ‚rawtlt‘, nötig.

### 5.2.5 EDX-Spektroskopie an Ultradünnschnitten (Reimer und Kohl, 2009)

Mit Hilfe einer Energie-dispersiven Röntgen-Spektroskopie (EDX-Spektroskopie) an positiv-kontrastierten Ultradünnschnitten war es möglich, ausgewählte Elemente innerhalb ausgewählter Bereiche nachzuweisen. Dazu wurde zunächst ein Probenbereich ausgewählt und mit Hilfe eines Pfeils markiert. Anschließend erfolgte Linescan entlang dieser Linie bei dem eine Voreinstellung auf bestimmte chemische Elemente deren quantitative Verteilung in diesem Bereich ermöglichte. Durchgeführt wurden diese Analyse von Prof. Dr. Josef Zweck im Elektronenmikroskopielabor der Fakultät für Physik an der Universität Regensburg.

### 5.2.6 Bildverarbeitung und Datenauswertung

Sämtliche am TEM und SEM (II.5.3) generierten Bilddateien in dieser Arbeit wurden mit Adobe® Photoshop® CS4 (Adobe Systems Incorporated, USA) und CoreIDRAW® X3 (Version 13.0.0.576, © 2005 Corel Corporation, US) nachbearbeitet und mit Längenstandards versehen.

Die Korrelationsmittelungen negativkontrastierter S-Layer-Präparate wurden an einem Silicon Graphics Rechner mit der Software SEMPER (Saxton, 1996) nach dem Protokoll von Engelhardt *et al.* durchgeführt (Engelhardt, 1988; Engelhardt *et al.*, 1991).

## 5.3 Rasterelektronenmikroskopie

Die Rasterelektronenmikroskopie (REM/SEM) wurde am Institut für Zahnerhaltung und Parodontologie von Prof. Dr. Schmalz im Zahnklinikum der Universitätsklinik Regensburg mittels eines FEI Quanta 400 mit Feldemissionskathode (FEI Co., Eindhoven, NL) ausgeführt. Für Übersichtsaufnahmen wurde bei Vergrößerungen zwischen 600- und 5000-fach mit einer Beschleunigungsspannung zwischen 1 und 10 kV und einer ‚spot size‘ von 3 gearbeitet. Bei Proben, die eine schlechte Ableitung der Elektronen zeigten, wurde die Beschleunigungsspannung auf 25 kV erhöht und eine ‚spot size‘ von 1 verwendet. Dadurch durchdrang ein Großteil der Elektronen das Präparat und Aufladungen, welche zu einer

Verschlechterung der Bildqualität führen können, wurden minimiert. Der Anteil an reflektierten Elektronen reichte dabei aus, um vom Detektor aufgenommen zu werden. Sofern eine entsprechende Ableitung der Elektronen gewährleistet war (Schwermetall-Bedampfung) konnte im Hochvakuum mit einem Druck unter 0.08 Torr gearbeitet werden. Für die Untersuchungen wurden die entsprechenden Objekte und Präparate entwässert (Abschnitte II.5.3.1 bis II.5.3.3) und mit doppelseitigen, leitfähigen Klebepads auf Aluminiumprobenhalter (Plano GmbH, Wetzlar) montiert.

### 5.3.1 Gefriertrocknung – Standardmethode (Rachel *et al.*, 2010)

Um eine möglichst natürliche Erhaltung der zellulären Strukturen zu gewährleisten, wurde eine Gefriertrocknungsmethode unter Zuhilfenahme der Hochvakuum-Bedampfungs- und Gefrierätzanlage (CFE 50; Cressington Ltd., Watford, UK) entwickelt. Dazu wurden bewachsene Oberflächen oder auch Zellesuspensionen mit 1 % Glutardialdehyd (Endkonzentration) für 15 min in Multiwellplatten (24 Well) (Sarstedt AG & Co., Nümbrecht) chemisch vorfixiert. Hierbei konnte zusätzlich noch auf einen Cacodylat-Puffer zurückgegriffen werden. Adhärente Zellen wurden auf ein Filterpapier kurz geblottet und in LN<sub>2</sub> kryofixiert. Zellsuspensionen wurden vor dem Fixieren in LN<sub>2</sub> auf frisch gespaltenen Glimmer (Plano GmbH, Wetzlar) als Objektträger appliziert. Nach der Montage auf den Präparathalter wurden die Proben in die mit LN<sub>2</sub> vorgekühlte Gefrierätzanlage eingeschleust (siehe II.5.2.2). Abweichend zu einer Gefrierätzung wurde hier der Halter auf -80 °C aufgeheizt, der Kupferblock mit -170 °C über die Proben geführt und die Proben für 120 min gefriergetrocknet. Anschließend wurde eine Rotationsbedampfung mit Platin/Kohle durchgeführt (II.5.4.4) und die Präparate im Exsikkator gelagert.

<u>Cacodylat-Puffer</u>	Dimethylarsensäure (Cacodylat)	140 mM
	CaCl <sub>2</sub>	2 mM
	NaCl	2.5 %
	Glutardialdehyd	1 – 2 %
	ad H <sub>2</sub> O <sub>millipore</sub>	
	pH 7.0 mit 1 M HCl einstellen	

### 5.3.2 Gefriertrocknung – Hochdurchsatz-Methode

Ab einer Probenmenge von 10 Präparaten wurden die Proben mit 1 % Glutardialdehyd in Cacodylat-Puffer chemisch fixiert (s.a. Standardmethode; II.5.3.1). Daraufhin wurde die Flüssigkeit abgesaugt und die Proben in Multiwellplatten (24 Well) in der Gefriertrocknungs-

anlage BETA 1-16 (Martin Christ Gefriertrocknungsanlagen, Osterode am Harz) automatisch nach einem voreingestellten Programm gefriergetrocknet. Im Anschluss daran wurden die Proben im Exsikkator aufbewahrt.

### 5.3.3 Entwässerung der Proben bei Raumtemperatur (Rachel *et al.*, 2010)

Für eine schnelle und einfache Präparation von Proben für die Rasterelektronenmikroskopie, bei denen die Qualität der Strukturhaltung nicht im Vordergrund stand, erfolgte die chemische Fixierung und Dehydratisierung bei Raumtemperatur (siehe auch III.1.4.2). Wie unter II.5.3.1 beschrieben erfolgte auch hier eine chemische Vorfixierung mit Glutardialdehyd. Bei einer Zellsuspension war es nötig, in Eppendorf-Reaktionsgefäßen zu arbeiten und die Zellen nach jedem folgenden Schritt erneut abzuzentrifugieren (5 min, 20000 x g, RT). Die Flüssigkeit wurde jeweils abgesaugt und die Zellen in einer Ethanol-Verdünnungsreihe mit ansteigender Konzentration (20, 50, 70, 96 und 100 %) dehydratisiert, wobei die Verweildauer in den einzelnen Verdünnungen 30 min betrug. Im Anschluss an den letzten Schritt wurden die Proben luftgetrocknet und im Exsikkator aufbewahrt.

### 5.3.4 Schwermetall-Bedampfung

Für detaillierte Aufnahmen, insbesondere im Hochvakuum und bei Proben mit geringer Leitfähigkeit wurden die Präparate entweder in der Hochvakuum-Bedampfungs- und Gefrierätzanlage (CFE 50; Cressington Ltd., Watford, UK) unter einem Winkel von 45 ° mit einer Schicht von 1 bis 2 nm Platin/Kohle rotationsbedampft oder in einer SEM Coating Unit E5100 (QuorumTechnologies Ltd., West Sussex, UK) mit 2 nm Gold (III.1.4.2) besputtert. Durch eine derartige Schwermetall-Bedampfung wurde zum einen die Ableitung der Elektronen verbessert und zum anderen der Kontrast erhöht.

## 6 Photometrische Bestimmung der Eisenkonzentration

Die Bestimmung der  $\text{Fe}^{2+}$ - und  $\text{Fe}^{3+}$ -Konzentration erfolgte photometrisch mit einem modifizierten Ferrozin-Assay nach Lovley und Phillips (1986). Hierbei wird zunächst die  $\text{Fe}^{2+}$ -Konzentration bestimmt und anschließend sämtliches  $\text{Fe}^{3+}$  mit Hilfe einer Reduktionslösung in zu  $\text{Fe}^{2+}$  reduziert. Hieraus ergab sich die Gesamtmenge an gelöstem Eisen, wodurch die Bestimmung der  $\text{Fe}^{3+}$ -Konzentration möglich war.

### 6.1 Reagenzien und Lösungen

<u>Ferrozin-Lösung</u>	Ferrozin	0.1 g
	HEPES	50 mM
	ad $\text{H}_2\text{O}_{\text{millipore}}$	100 ml
	pH 7.0 mit 1 M HCl einstellen	
<u>Reduktionslösung (2x)</u>	Ammoniumhydroxid	0.5 M
	HCl	0.5 M
	ad $\text{H}_2\text{O}_{\text{millipore}}$	

### 6.2 Erstellung einer Eichkurve

Um eine Eichkurve erstellen zu können wurde eine 10 mM Stammlösung mit Eisen(II)chlorid hergestellt, wobei zusätzlich HCl und Ammoniumhydroxid hinzugefügt wurden. Dadurch wurde gewährleistet, dass Eisen ausschließlich als  $\text{Fe}^{2+}$  vorliegt.

<u><math>\text{Fe}^{2+}</math>-Eichlösung</u>	$\text{FeCl}_2 \times 4 \text{H}_2\text{O}$	10 mM
	HCl	0.25 M
	Ammoniumhydroxid	0.25 M
	ad $\text{H}_2\text{O}_{\text{millipore}}$	100 ml

Aus dieser Stammlösung wurde eine Verdünnungsreihe mit  $\text{Fe}^{2+}$ -Konzentration zwischen 0 und 1 mM hergestellt, wobei 1 mM Eisen(II)chlorid einer Konzentration von  $198.8 \mu\text{g Fe}^{2+}$  pro ml entspricht. Aus dieser Verdünnungsreihe wurden jeweils  $75 \mu\text{l}$  mit  $925 \mu\text{l}$  der Ferrozin-Lösung gemischt und in einer Plastikkuvette die Absorption bei  $562 \text{ nm}$  ( $A_{562}$ ) im Photometer (U 2000 Spectrophotometer, Hitachi, Krefeld) ermittelt. Als Nullabgleich diente hierbei  $1 \text{ ml}$  der Ferrozin-Lösung. Mit Hilfe der Absorptionswerte ließ sich daraufhin eine Eichgerade erstellen. Die Absorption ist dabei direkt proportional zur Eisenkonzentration und durch Ermittlung der Steigung konnte aus Absorptionswerten die jeweilige  $\text{Fe}^{2+}$ -Konzentration einer beliebigen Lösung bestimmt werden.

### 6.3 Bestimmung der Eisenkonzentration in Kulturen

Für die Bestimmung der Eisenkonzentration in Kulturen aus Laugungsexperimenten wurden zu unterschiedlichen Zeitpunkten jeweils etwa  $200 \mu\text{l}$  Kulturmedium entnommen. Nach der Kontrolle der Zellzahlen (II.5.1.2) und des pH-Wertes mittels pH-Indikatorstreifen mit  $50 \mu\text{l}$  der Probe, wurde die restliche Probe bei  $20000 \times g$  abzentrifugiert um Zellen, Pyrit oder Präzipitate im Überstand zu vermeiden. Aus diesem Überstand wurden  $75 \mu\text{l}$  zusammen mit  $925 \mu\text{l}$  Ferrozin-Lösung direkt zur Bestimmung der  $\text{Fe}^{2+}$ -Konzentration entsprechend II.6.2 eingesetzt. Da eine Proportionalität der Eisenkonzentration zu den  $A_{562}$ -Werten nur in einem Bereich zwischen 0 und 1.0 gegeben war, mussten die Proben im Vorfeld gegebenenfalls 1:10 oder 1:100 mit  $\text{H}_2\text{O}_{\text{millipore}}$  verdünnt werden. Weitere  $75 \mu\text{l}$  wurden mit  $75 \mu\text{l}$  der Reduktionslösung (2x) gemischt und für 2 h schüttelnd inkubiert. Diese  $150 \mu\text{l}$  der reduzierten Lösung wurden ebenfalls mit  $925 \mu\text{l}$  Ferrozin-Lösung gemischt und daraus die Gesamteisenkonzentration in Lösung ermittelt. Durch Subtraktion mit dem Wert für  $\text{Fe}^{2+}$  ließ sich hieraus die  $\text{Fe}^{3+}$ -Konzentration bestimmen.

## 7 Proteinbiochemie

### 7.1 Zellaufschluss

Vor dem Aufschluss der Zellen wurden die Zellen durch Zentrifugation bei  $20000 \times g$  (Beckman) in  $15 \text{ ml}$  Corex-Röhrchen und einem JA 25.50 Rotor aufkonzentriert und in  $5 \text{ ml}$  MES-Puffer (pH 6,0) oder Acetat-Puffer (pH-Wert 4,6) resuspendiert (siehe II.7.2.1). Die Menge an eingesetztem NaCl und der zweiwertigen Kationen ( $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ) wurden dabei an das jeweilige Inkubationsmedium angepasst. Falls notwendig, konnte an dieser Stelle zusätzlich ein Lyse-Puffer (II.7.2.1) verwendet werden.

Der Zellaufschluss erfolgte daraufhin mit Ultraschall in einer Bandelin Sonoplus (Zeit: 10 sec; cycle 2 x 10 %; Power 25 %). Um störende DNA aus der Präparation zu entfernen, wurden anschließend bei Raumtemperatur für 30 min 50 µg/ml Desoxyribonuklease II hinzugefügt.

## 7.2 S-Layer-Präparation

### 7.2.1 Puffer und Lösungen

<u>MES-Puffer</u>	MES	25 mM
	MgSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O	5 mM
	CaCl <sub>2</sub> x 2 H <sub>2</sub> O	1 mM
	ad H <sub>2</sub> O <sub>millipore</sub>	
	pH-Wert mit 1 M NaOH oder HCl auf 6.0 einstellen	

<u>Natriumacetat-Puffer</u>	Natriumacetat	25 mM
	Essigsäure	25 mM
	MgSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O	5 mM
	CaCl <sub>2</sub> x 2 H <sub>2</sub> O	1 mM
	ad H <sub>2</sub> O <sub>millipore</sub>	
pH-Wert stellt sich automatisch auf 4.6 ein		

<u>Lyse-Puffer</u>	Na <sub>2</sub> EDTA	1 mM
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	5 mM
	MgSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O	1.4 mM
	PMSF 0.2 M (in EtOH)	1 mM
	H <sub>2</sub> O <sub>millipore</sub>	ad 100 ml

- Für den hypotonen Puffer ergab sich ein pH-Wert von 4.4
- PMSF erst vor der Benutzung des Puffers zugeben und nicht mit autoklavieren
- Lagerung bei 4 °C

### 7.2.2 Differentielle Zentrifugation und Lipidextraktion mit Detergenz

Nach dem enzymatischen Verdau der DNA wurde die Suspension bei 48000 x g für 15 min bei 4 °C abzentrifugiert (Beckman, JA 25.50) und der Überstand abgenommen. Das Zellpellet wurde in 2 ml MES- oder Acetat-Puffer aufgenommen, welcher eine entsprechende Menge des verwendeten Detergenz SDS oder Genapol X-080 (Stammlösung 10 %) enthielt. Nach der Zugabe von 1 % SDS bzw. 1.5 % Genapol X-080 (vorgewärmt auf 50 °C) erfolgte eine Inkubation für 1 h bei 60 °C (Detergenzkonzentrationen und Temperaturen nach Klingl, 2007).

Im Anschluss wurde erneut 15 min bei 48000 x g und 4 °C zentrifugiert und das Pellet zweimal gewaschen, indem man den Überstand entfernte, jeweils mit 10 ml MES- oder Acetat-Puffer resuspendierte und erneut bei 48000 x g zentrifugierte. Nach dem letzten Schritt wurde das Pellet in 50 µl MES- oder Acetat-Puffer aufgenommen. Aus 5 µl dieser Präparation wurden Suspensionspräparate für die Elektronenmikroskope hergestellt (II.5.2.1). Die restliche Suspension stand für die Proteinanalytik zur Verfügung.

### 7.2.3 Chemische Deglykosylierung mit HF-Pyridin

Die chemische Deglykosylierung von S-Layer-Proteinen wurde nach der Methode von van Holst und Varner (1984), modifiziert nach Kilz *et al.* (2002), durchgeführt. Hierzu wurden die Proben zunächst in einem modifizierten Probenpuffer (II.7.4.2) ohne Glycerin und Bromphenolblau für 20 min denaturiert. Von dieser Lösung wurde ein Volumen, welches etwa 100 µg Protein entspricht (siehe auch II.7.3), zusammen mit 20 µl wasserfreiem Methanol und 180 µl HF-Pyridin gemischt und für 90 min bei Raumtemperatur inkubiert. Diese Reaktion wurde mit 2 ml n-Octylglucosid (30 mM in 1 M Tris) gestoppt, die Proben anschließend gegen H<sub>2</sub>O<sub>millipore</sub> dialysiert und schließlich lyophilisiert (II.7.6.2). Die so getrockneten und deglykosylierten Proteine wurden in Probenpuffer aufgenommen und einer SDS-Gelelektrophorese unterzogen.

## 7.3 Bestimmung der Proteinkonzentration

Um die Konzentration der Proteine in den S-Layer Präparationen zu bestimmen, wurde die Methode nach Bradford (1976) in modifizierter Form angewandt. Dazu wurde zunächst eine Eichgerade mit BSA-Lösungen verschiedener Konzentrationen erstellt: 0.0 mg/ml; 0.1 mg/ml; 0.3 mg/ml; 0.6 mg/ml; 1.2 mg/ml; 2.4 mg/ml. Von diesen Lösungen wurden jeweils 10 µl mit 990 µl Coomassie Reagenz (Roti®-Quant, Roth, Karlsruhe) vermischt, welche zuvor 1:5 in H<sub>2</sub>O<sub>millipore</sub> verdünnt und abfiltriert wurde. Dieses Gemisch wurde dann für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Entsprechend diesem Vorgehen wurde mit jeweils 10 µl der zu

messenden Proteinlösung verfahren. Von diesen Proben wurde die Absorption bei 450 nm und 590 nm im Photometer (U 2000 Spectrophotometer, Hitachi, Krefeld) gemessen. Als Referenz diente  $\text{H}_2\text{O}_{\text{millipore}}$ . Aus den gewonnenen Werten ließ sich der Quotient  $A_{590}/A_{450}$  bilden. Abzüglich des Wertes aus der Messung der Standardprobe mit 0.0 mg/ml BSA ergab sich der korrigierte Wert  $\text{corr. } A_{590}/A_{450}$ . Aus den Quotienten der eingesetzten BSA-Mengen und der jeweiligen  $\text{corr. } A_{590}/A_{450}$ -Werte wurde daraufhin der Mittelwert bestimmt. Um nun die Proteinkonzentration in einer beliebigen Probe bestimmen zu können, wurde zunächst der  $\text{corr. } A_{590}/A_{450}$ -Wert ermittelt, mit dem zuvor errechneten Mittelwert multipliziert und das Ergebnis durch 10 dividiert. Der daraus resultierende Wert entspricht der Proteinkonzentration der Probe in  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ .

## 7.4 SDS Polyacrylamid Gelelektrophorese

### 7.4.1 Herstellung der Gele

<u>Sammelgelpuffer</u>	Tris/HCl, pH 6.8 ad $\text{H}_2\text{O}_{\text{millipore}}$	0.5 M
<u>Trenngelpuffer</u>	Tris/HCl, pH 8.8 ad $\text{H}_2\text{O}_{\text{millipore}}$	1.5 M

Für weiterführende Protein-analytische Untersuchungen der S-Layer-Präparationen wurden die enthaltenen Proteine mit Hilfe einer denaturierenden, diskontinuierlichen Natriumdodecylsulfat Polyacrylamid Gelelektrophorese (SDS-PAGE) mit Flachgelen nach Laemmli (1970) in Kombination mit einem modifizierten Puffersystem nach Schagger und von Jagow (1987) entsprechend ihrer apparenten Massen aufgetrennt. Hierzu wurden 10%ige Trenngele verwendet, die nach 30-minütiger Polymerisation mit einem 4%igen Sammelgel überschichtet und mit einem Gel-Kamm versehen wurden. Die Zusammensetzung der Gele ist der folgenden Tabelle zu entnehmen.

Substanz	Sammelgel, 4 %	Trenngel, 10 %
Acrylamid-Bisacrylamid-Lösung (37.5 : 1)	0.3 ml	2.0 ml
Sammel-/Trenngelpuffer	0.5 ml	1.5 ml
H <sub>2</sub> O <sub>millipore</sub>	1.2 ml	2.5 ml
APS, 10 % (w/v in H <sub>2</sub> O <sub>millipore</sub> )	15 µl	30 µl
TEMED	3.0 µl	5.0 µl

**Tabelle 12:** Zusammensetzung der SDS-Gele.

#### 7.4.2 Vorbereitung der Proben für die Gelelektrophorese

<u>Probenpuffer (2x)</u>	Tris/HCl, pH 9.5	50 mM
	Na <sub>2</sub> EDTA	10 mM
	Glycerin	10 % (w/v)
	SDS	5 % (w/v)
	Bromphenolblau (BPB)	0.01 % (w/v)
	DTT	5 mM
	ad H <sub>2</sub> O <sub>millipore</sub>	

Der Probenpuffer wurde mit Ausnahme von Dithiothreitol (DTT) hergestellt und bei Raumtemperatur gelagert. Kurz vor Gebrauch wird dem Probenpuffer jeweils ein entsprechendes Volumen des Reduktionsmittels DTT (Stammlösung 0.1 M) zugegeben. Vorbereitend zur Gelelektrophorese wurden die Proteinlösungen mit dem komplettierten Probenpuffer (1:1) gemischt und für 15 min bei 95 °C im Wasserbad (Thermoinkubator, Haake DC3, Haake, Karlsruhe) inkubiert.

#### 7.4.3 Gelelektrophorese – Bedingungen und Puffersystem

<u>Laufpuffer – Kathode</u>	Tris	100 mM
	Tricin	100 mM
	SDS	0.1 % (w/v)
	ad H <sub>2</sub> O <sub>millipore</sub>	

Laufpuffer - Anode

Tris

200 mM

ad H<sub>2</sub>O<sub>millipore</sub>

Die Auftrennung der denaturierten Proteine (entsprechend II.7.4.2) im elektrischen Feld erfolgte in einer Biometra Elektrophoreseapparatur bei Raumtemperatur. Hierbei betrug die angelegte Stromstärke 10 mA im Sammelgel (etwa 20 min) und 25 mA im Trenngel (Powersupply: MBP 3000 EP, IBI Powersupplies, Kodak Int. Biotech. New Haven, USA). Der Grund für die Verwendung eines diskontinuierlichen Tris-Tricin-Laufpuffer-Systems war eine daraus resultierende Optimierung hinsichtlich der Auftrennung kleiner Proteine und Peptide (Schägger und von Jagow, 1987).

#### 7.4.4 Gelfärbemethoden und Dokumentation

Bei allen aufgeführten Gelfärbemethoden erfolgte die Inkubation schüttelnd bei Raumtemperatur.

##### 7.4.4.1 Coomassie-Färbung modifiziert nach Neuhoff *et al.* (1988)

Die Coomassie-Färbung von SDS-Gelen und PVDF-Membranen bot die Möglichkeit, den Erfolg der vorausgegangenen Präparation der Proteine zu kontrollieren sowie deren ungefähre Konzentrationen für eine anschließende, massenspektrometrische Proteinidentifikation oder einen tryptischen Verdau der Proteine abzuschätzen (II.7.6.2). Bei der klassischen Coomassie-Färbung liegt die Nachweisgrenze bei etwa 400 ng Protein pro cm<sup>2</sup>. Banden, welche mit dieser Färbemethode detektiert wurden, erfüllten somit auch das Kriterium der Mindestproteinkonzentration, welche für eine weitere Identifikation notwendig war. Die Färbung der Gele erfolgte nach folgendem Schema.

Schritt	Lösung	Dauer
Fixieren	30 % (v/v) Methanol 10 % (v/v) Essigsäure	30 min
Färbung	0.2 % (w/v) Coomassie Brilliant Blue R 250 30 % (v/v) Methanol 10 % (v/v) Essigsäure	1 h
Entfärbung	30 % (v/v) Methanol 10 % (v/v) Essigsäure	Bis Banden deutlich zu erkennen sind
Lagerung	5 % (v/v) Essigsäure	-

**Tabelle 13:** Coomassie- Färbung modifiziert nach Neuhoff *et al.*, (1988).

Für die Färbung von PVDF-Membranen wurde eine „PageBlue™ Protein Staining Solution“ (R0579, Fermentas, St. Leon-Rot) verwendet, welche sich durch hohe Sensitivität und gute Reproduzierbarkeit auszeichnet. Die Membran wurde nach dem Elektrobplot für 1 – 2 min in der Färbelösung inkubiert und anschließend mit 30 % Ethanol (v/v in H<sub>2</sub>O<sub>millipore</sub>) entfärbt.

#### 7.4.4.2 Silber-Färbung nach Blum *et al.* (1987)

Im Vergleich zur Coomassie-Färbung ist die Silber-Färbung mit einer Protein-Nachweisgrenze von 10 ng/cm<sup>2</sup> deutlich sensitiver (Blum *et al.*, 1987). Aus diesem Grund war diese Färbemethode bei Proteinlösungen unbekannter Konzentration das ideale Darstellungsverfahren. Durch die Quervernetzung der Proteine mit Formaldehyd können diese jedoch nicht mehr für eine massenspektrometrische Analyse eingesetzt werden.

Schritt	Lösung	Dauer
Fixieren	50 % (v/v) Methanol 10 % (v/v) Essigsäure	30 min
Waschen I	50 % (v/v) Ethanol	10 min
Waschen II	10 % (v/v) Ethanol	10 min
Blockieren	0.02 % (w/v) Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	1 min
Waschen III	H <sub>2</sub> O <sub>millipore</sub>	3 x 20 sec
Färben	0.1 % (w/v) AgNO <sub>3</sub> 0.027 % (v/v) Formaldehyd	20 min
Waschen IV	H <sub>2</sub> O <sub>millipore</sub>	3 x 20 sec
Entwickeln	6 % (w/v) Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	je nach Bandenintensität
Stoppen	10 % (v/v) Essigsäure	mindestens 15 min

**Tabelle 14:** Silberfärbung nach Blum *et al.* (1987).

## 7.4.4.3 Periodat-Schiff-Färbung nach Segrest und Jackson (1972)

Für den Nachweis potentiell glykosylierter Proteine wurden die Gele einer Periodat-Schiff-Färbung (PAS-Färbung) unterzogen. Durch eine sogenannte Hotchkiss-MacManus-Reaktion erscheinen Proteinbanden, welche eine mögliche Glykosylierung aufweisen, pink. Im Anschluss an die PAS-Färbung wurden die Gele vollständig entfärbt und einer Coomassie-Färbung (II.7.4.4.1) oder einer Silber-Färbung (II.7.4.4.2) unterzogen.

Schritt	Lösung	Dauer
Fixieren	40 % (v/v) Ethanol 5 % (v/v) Essigsäure	30 min
Oxidation	0.7 % (w/v) Periodat 5 % (v/v) Essigsäure	2 h
Reduktion	0.2 % (w/v) Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>5</sub> 5 % (v/v) Essigsäure	30 min
Färben	Schiff-Reagenz	12 – 24 h
Entfärben	0.1 % (w/v) Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>5</sub> 5 % (v/v) Essigsäure	bis das Gel entfärbt ist
Lagern	5 % (v/v) Essigsäure	-

**Tabelle 15:** Periodat-Schiff-Färbung nach Segrest und Jackson (1972).

7.4.4.4 Alcianblau-Färbung (Cowman *et al.*, 1984; modifiziert nach Veith, 2006)

Für den Nachweis potentiell glykosylierter Proteine wurde zusätzlich eine Alcianblau-Färbung der Gele durchgeführt. Mit Hilfe dieser Methode, bei der entsprechende Proteinbanden blau erscheinen, sollten die Resultate der PAS-Färbung verifiziert werden.

Schritt	Lösung	Dauer
Fixieren	12.5 % (w/v) Trichloressigsäure	2 h
Waschen I	H <sub>2</sub> O <sub>millipore</sub>	5 min
Oxidation	1 % (w/v) Periodsäure; 3 % (v/v) Essigsäure	50 min
Waschen II	H <sub>2</sub> O <sub>millipore</sub>	5 min
Reduktion	0.5 % (w/v) K <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	30 min
Waschen III	H <sub>2</sub> O <sub>millipore</sub>	5 min
Färben	0.5 % (w/v) Alcianblau; 3 % (v/v) Essigsäure	12 – 24 h
Waschen IV	H <sub>2</sub> O <sub>millipore</sub>	5 min
Entfärben	10 % (v/v) Essigsäure	bis Gel entfärbt ist
Lagern	5 % (v/v) Essigsäure	-

**Tabelle 16:** Alcianblau-Färbung (Cowman *et al.*, 1984; modifiziert nach Veith, 2006).

#### 7.4.4.5 Dokumentation und Trocknung der Gele

Zur Dokumentation wurden die Acrylamid-Gele auf einem Leuchtschirm fotografiert und digitalisiert. Zusätzlich wurden die Gele mit Hilfe eines Gelrocknungssystems (Dry Ease™ System, Invitrogen, Karlsruhe) getrocknet und konserviert, indem sie für 15 min in der folgenden Lösung geschwenkt wurden. Die Trocknung erfolgte eingespannt in eine entsprechende Halterung zwischen zwei Cellophanfolien (Dry Ease™ Minicellophane, Invitrogen, Karlsruhe) über Nacht.

<u>Gelrocknungs-Lösung</u>	Ethanol	22 % (v/v)
	2-Propanol	1.0 % (v/v)
	Glycerin	2.0 % (v/v)
	ad H <sub>2</sub> O <sub>millipore</sub>	

pH-Wert stellt sich automatisch auf etwa 5.0 ein

## 7.5 Western Blot

### 7.5.1 Transfer der Proteine auf PVDF-Membranen

<u>Transfer-Puffer</u>	Tris	25 mM
	Glycin	192 mM
	Methanol	20 % (v/v)
	ad H <sub>2</sub> O <sub>millipore</sub>	

pH-Wert stellt sich automatisch auf 8.3 ein

Zur Aktivierung wurde die zurechtgeschnittene PVDF-Membran (Immobilon P, Ø 0.2 µm, Millipore, Bedford, USA) für 1 min in Methanol (p.a.) geschwenkt. Im Folgenden wurden sechs Stück Whatman® Papier (Biometra, Göttingen) zusammen mit der Membran und getrennt vom Gel in dem oben beschriebenen Transferpuffer nach Towbin *et al.* (1979) für 15 min inkubiert. Danach wurde alles entsprechend der Herstellerangaben in einer Semi Dry Blot-Apparatur (Trans Blot SD Semi Dry Transfer Cell, Biorad, München) blasenfrei zusammengesetzt und die Proteine für eine Stunde bei einer konstanten Spannung von 11 V auf die Membran übertragen.

### 7.5.2 Immunologischer Nachweis von Proteinen

<u>TBS+T-Puffer</u>	Tris/HCl, pH 7.6	20 mM
	NaCl	137 mM
	Tween 20 (T)	0.1 % (v/v)
	Magermilchpulver (MM)	1 %; 3 %; 5 % (w/v)
	ad H <sub>2</sub> O <sub>millipore</sub>	
<u>TBS-Puffer</u>	wie TBS+T ohne Tween 20	
<u>Anfärbepuffer</u>	Tris/HCl, pH 8.8	100 mM
	NaCl	100 mM
	MgCl <sub>2</sub> x 6 H <sub>2</sub> O	5 mM
	ad H <sub>2</sub> O <sub>millipore</sub>	

Nach einem erfolgreichen Transfer der Proteine auf die PVDF-Membran konnten die Zielproteine mit Hilfe spezifischer primärer (1° AK) und sekundärer Antikörper (2° AK; II.1.4) nachgewiesen werden. Detektiert wurden die entsprechenden Banden durch eine enzymatische Reaktion mit Hilfe einer alkalischen Phosphatase, gekoppelt an den sekundären Antikörper. Die dazu benötigte Detektionslösung bestand aus 80 µl NBT/BCiP Stocklösung (Roche, Mannheim) in 10 ml Anfärbepuffer.

Schritt	Lösung	Dauer
Waschen I	TBS+T	10 min
Blockieren	TBS+T + 5 % MM	1 h
Waschen II	TBS+T	10 min
Markierung 1°	1° AK in TBS+T + 3 % MM	1 h
Waschen III	TBS+T	4 x 10 min
Markierung 2°	2° AK in TBS+T + 1 % MM	1 h
Waschen IV	TBS+T	3 x 10 min
Waschen V	TBS	2 x 10 min
Detektion	NBT/BCiP in Anfärbepuffer	bis Banden sichtbar
Stoppen	H <sub>2</sub> O <sub>millipore</sub>	-

**Tabelle 17:** Immunologischer Nachweis von Proteinen auf PVDF-Membranen.

## 7.6 Identifizierung von Proteinen

Im Vorfeld einer proteinbiochemischen Untersuchung ausgewählter Proteine wurden diese mittels SDS PAGE (siehe Kap. II.7.4) aufgetrennt.

### 7.6.1 N-terminale Sequenzierung

Für eine N-terminale Sequenzierung nach Edman (1950) wurden die Proteine zunächst im elektrischen Feld auf eine Membran (II.7.4) übertragen. Nach einer Coomassie-Färbung (II.7.4.4.1) wurden die gewünschten Banden mit einem Skalpell ausgeschnitten und in sterilem Wasser gelagert. Alle weiteren Schritte wurden von Eduard Hochmuth am Institut für Biochemie der Universität Regensburg im Labor von Prof. Dr. Deutzmann durchgeführt. Die so gewonnenen N-terminalen Sequenzen standen für weitere bioinformatische Auswertungen zur Verfügung.

### 7.6.2 Massenspektrometrie tryptischer Peptide – MALDI MS/MS

Da eine direkte N-terminale Sequenzierung der Proteine nicht immer erfolgreich war, erfolgte ein In-Gel-Verdau der entsprechenden Proteinbanden mit Trypsin (Stone *et al.*, 1989; Allen, 1989). Dazu wurden die Proteine ebenfalls über eine SDS-PAGE aufgetrennt (II.7.4) und anschließend einer Coomassie-Färbung unterzogen (II.7.4.4.1). Aus diesem Gel wurden die gewünschten Banden präzise mit einem Skalpell ausgeschnitten, das Volumen abgeschätzt,

in 1 mm<sup>3</sup> kleine Würfel zerteilt und in 1.5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäße überführt. Anschließend wurden die Gelstücke je 30 min in 200 µl der folgenden Lösungen inkubiert. Nach jedem Schritt wurden die Flüssigkeiten komplett abgenommen.

Schritt	Lösung	Konzentration	Menge
1	1 M (w/v) NH <sub>4</sub> HCO <sub>3</sub>	50 mM	50 µl
	H <sub>2</sub> O <sub>millipore</sub>		950 µl
2	1 M (w/v) NH <sub>4</sub> HCO <sub>3</sub>	50 mM	50 µl
	Acetonitril	25 %	250 µl
3	H <sub>2</sub> O <sub>millipore</sub>		700 µl
	Acetonitril	25 %	250 µl
4	H <sub>2</sub> O <sub>millipore</sub>		750 µl
	Acetonitril	50 %	500 µl
	H <sub>2</sub> O <sub>millipore</sub>		500 µl

**Tabelle 18:** Waschen der Gelstücke.

Die so gewaschenen Gelstücke wurden in der Gefriertrocknungsanlage BETA 1-16 (Martin Christ Gefriertrocknungsanlagen, Osterode am Harz) lyophilisiert und in Safe-Lock-Tubes (0.5 ml; Sarstedt AG & Co., Nümbrecht) überführt. Der In-Gel-Verdau erfolgt mit Trypsin (Sequencing Grade; Endkonzentration 2 µg/100 µl), wobei das eingesetzte Volumen das 1.5-fache des vorher bestimmten Gelvolumens betrug. Die Aktivierung des Trypsins erfolgte in 50 mM NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> (pH 8.5). Zunächst wurde die Hälfte des Puffervolumens, welche das gesamte Trypsin enthielt (5 µg/100 µl) zugegeben und für 5 min inkubiert. Nach Zugabe des restlichen Puffers erfolgte eine Inkubation über Nacht bei 37 °C. Der resultierende Überstand wurde verworfen, bevor die Peptide mit je 30 µl der folgenden Lösungen für 1 bis 2 Stunden extrahiert wurden.

Schritt	Lösung	Konzentration	Menge
1	1 M (w/v) NH <sub>4</sub> HCO <sub>3</sub>	100 mM	100 µl
	H <sub>2</sub> O <sub>millipore</sub>		900 µl
2	1 M (w/v) NH <sub>4</sub> HCO <sub>3</sub>	100 mM	100 µl
	H <sub>2</sub> O <sub>millipore</sub>		900 µl
3	1 M (w/v) NH <sub>4</sub> HCO <sub>3</sub>	100 mM	100 µl
	Acetonitril	50 %	500 µl
	H <sub>2</sub> O <sub>millipore</sub>		400 µl

**Tabelle 19:** Extraktion der Peptide aus den Gelstücken.

Sämtliche Extraktionsüberstände wurden in einem Safe-Lock-Tube vereint und dem Institut für Biochemie von Prof. Dr. Deutzman für die Sequenzierung mittels MALDI MS/MS

übergeben (Karas *et al.* 1987; Karas und Hillenkamp, 1988; Tanaka *et al.*, 1988; Papayannopoulos, 1995; Kolker *et al.*, 2006).

### 7.6.3 Bioinformatische Auswertung der Peptid- und Proteinsequenzen

Die MALDI MS/MS-Analyse der Peptide erlaubte es, anhand spezifischer und typischer Fragmentierungsmuster, Rückschlüsse auf die Aminosäuresequenz zu ziehen. Diese Peptidsequenzen standen ebenso wie die N-terminalen Proteinsequenzen (II.7.6.1) für eine weiterführende bioinformatische Auswertung zur Verfügung.

Die Peptidsequenzen wurden gegen annotierte Genomsequenzen von *A. ferrooxidans*, *A. caldus* und *M. sedula* abgeglichen (DOE Joint Genome Institute (JGI, Version November 2010); National Center for Biotechnology Information (NCBI, Version November 2010)). Nach der bioinformatischen Analyse der N-terminalen Sequenzen und der Identifizierung der Proteine konnten diese mit den öffentlichen Datenbanken abgeglichen werden.

Die Bestimmung der Molekularmassen und des isoelektrischen Punktes erfolgte mit Hilfe von ProtParam (Gasteiger *et al.*, 2005), eine Identifikation konservierter Domänen mit der Datenbank PFAM 24.0 (Finn *et al.*, 2010). Für die Vorhersage einer potentiellen Signalsequenz wurden verschiedene Programme verwendet: TatFind 1.4 (Rose *et al.*, 2002) zur Erkennung archaeeller und bakterieller TAT-Signalpeptide (TAT: twin arginin translocation), Phobius (Käll *et al.*, 2004) für eine kombinierte Vorhersage von Transmembranabschnitten und Signalpeptiden und FlaFind 1.0 (Szabó *et al.*, 2007a) für die Vorhersage archaeeller Class III (type IV, pilin like) Signalpeptide und von Prepilin-Peptidase-Schnittstellen. Die auf dem Server der Technischen Universität von Dänemark verfügbaren Programme NetNGlyc 1.0 (Gupta und Brunak, 2002) und NetOGlyc 3.0 (Julenius *et al.*, 2005) ermöglichten es, innerhalb der Aminosäuresequenz mögliche N- bzw. O-glykosylierungsstellen zu finden.

Folgende Programme zur Vorhersage von Transmembrandomänen, Sekundärstrukturvorhersage und Klassifizierung von Membranproteinen wurden genutzt: Phobius, SOSUI (Hirokawa *et al.*, 1998) und TMHMM 2.0 (Krogh *et al.*, 2001). Das Programm Phyre 0.2 (Bennett-Lovsey *et al.*, 2008; Kelley und Sternberg, 2009) diente zusätzlich zur Vorhersage dreidimensionaler Proteinstrukturen und PSORTb 3.0 (Yu *et al.*, 2010) zur Vorhersage der subzellulären Lokalisation von Proteinen.

Sofern von den entsprechenden Proteinen bereits Strukturdaten in der NCBI Strukturdatenbank MMDB (Chen *et al.*, 2003; Wang *et al.*, 2007) beziehungsweise der RCSB Protein Data Bank (PDB; <http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do>) vorlagen, konnten diese unter anderem mit dem Programm RasMol (RasWin Molecular Graphics, Version 2.7.5) dargestellt werden. Anschließend konnte man sie in Adobe® Photoshop® CS4 (Adobe Systems Incorporated, USA) exportieren und nachbearbeiten. Für ein Alignment multipler

Aminosäuresequenz standen die Tools COBALT (Papadopolous und Agarwala, 2007) sowie MUSCLE (Edgar, 2004) zur Verfügung.

## 8 Immunologische Lokalisation von Proteinen

### 8.1 Generierung Protein-spezifischer Antikörper

Die Isolation der entsprechenden S-Layer- oder Membranproteine erfolgte entsprechend dem Protokoll unter II.7.2.2. Nach der Auftrennung der Proteine auf einem SDS-Gel wurden ausgewählte Banden mit einem Skalpel ausgeschnitten und in sterilem  $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$  gelagert. Diese Gelbanden wurden der Firma Davids Biotechnologie übergeben und es erfolgte eine konsekutive Immunisierung in Kaninchen. Die Antikörper im Serum des Kaninchens wurden durch eine Affinitätschromatographie (Protein G-Säule) aufgereinigt.

Um den Erfolg der Immunisierung überprüfen zu können, wurde jeweils auch Präimmunsersum zur Verfügung gestellt.

### 8.2 Puffer und Lösungen

Die Zusammensetzung der für die Immunmarkierung benötigten Puffer und Lösungen war wie folgt:

<u>PBS-Puffer</u>	NaCl	137 mM
	KCl	2.7 mM
	$\text{Na}_2\text{HPO}_4$	10 mM
	$\text{KH}_2\text{PO}_4$	1.76 mM
	pH 7.4 mit 1 M HCl einstellen	
<u>PBG-Puffer</u>	Gelatine	0.2 g
	BSA	0.5 g
	PBS-Puffer	ad 100 ml

<u>SDS-Lösung</u>	SDS	2.5 %
	Tris	10 mM
	Saccharose	30 mM
	H <sub>2</sub> O <sub>millipore</sub>	ad 100 ml
	pH 8.3 mit 1 M HCl einstellen	

### 8.3 Immunmarkierung für die Elektronenmikroskopie

#### 8.3.1 Freeze-fracture labeling nach Fujimoto (1995)

Für eine Markierung von Proteinen an Gefrierbrüchen wurde die sogenannte Fracture Label Technik angewandt. Dabei wurde das Gefrierbruch-Protokoll (II.5.2.2) variiert und anstelle des Abflottierens auf Schwefelsäure eine 2.5%ige SDS-Lösung hinzugegeben. Die darauffolgenden einzelnen Arbeitsschritte sind im folgenden Protokoll tabellarisch beschrieben. Hierbei kamen die spezifisch generierten primären Antikörper (II.8.1) zur Anwendung, welche für die Immunmarkierung 1:50 in PBG-Puffer verdünnt wurden. Der verwendete sekundäre Antikörper goat anti-rabbit (1:20 in PBG-Puffer verdünnt) war an 6 nm Gold gekoppelt (Aurion, Wageningen, NL) und konnte so im Elektronenmikroskop detektiert werden.

Schritt	Lösung	Dauer
Entfernen zellulärer Bestandteile	SDS-Lösung	5 min
Waschen	PBS-Puffer	4 x 20 min
Blockieren	PBG-Puffer	30 min
Primäre Antikörpermarkierung (1° AK)	AK 1:50 verdünnt in PBG-Puffer	30 min
Waschen	PBG-Puffer	3 x 10 min
Sekundäre Antikörpermarkierung (2° AK)	AK 1:20 verdünnt in PBG-Puffer	30 min
Waschen	PBG-Puffer	3 x 10 min
Waschen	PBS-Puffer	3 x 2 min
Vernetzung von Epitop, 1° AK und 2° AK	PBS-Glutardialdehyd 0.5 % (v/v)	5 min
Waschen	H <sub>2</sub> O <sub>millipore</sub>	2 x 2 min

**Tabelle 20:** Freeze-fracture labeling nach Fujimoto (1995).

Nach dem letzten Waschschrift wurden die Replika auf unbefilmte, beglimmte hexagonale Kupfernetzchen (G700HEX, Plano GmbH, Wetzlar) aufgenommen und luftgetrocknet.

### 8.3.2 Immunmarkierung an Ultradünnschnitten – Immunogold labeling

Für die Immunlokalisation zellulärer Proteine in Dünnschnitten wurden spezifisch generierte Antikörper als primäre Antikörper (II.8.1) und goat anti-rabbit IgG mit 6 nm Gold (Aurion, Wageningen, NL) als sekundärer Antikörper (II.1.4) in einem PBS-Puffersystem verwendet (II.8.2).

PBS-Puffer diente als Grundlage für die einzelnen Lösungen (Glycin-, BSA- oder Glutardialdehyd-haltig, siehe unten), welche für die Immunmarkierung an Ultradünnschnitten benötigt werden. Die einzelnen Lösungen wurden dabei zunächst auf Parafilm getropft und die Präparate auf Nickel-Grids mit der Probenseite nach unten auf die Tropfen darüber gelegt. Sämtliche Antikörperlösungen wurden unmittelbar vor dem Experiment hergestellt und für 3 min bei 20000 x g in einer Tischzentrifuge bei RT (Typ 5417 C, Eppendorf AG, Hamburg) abzentrifugiert. Im Anschluss an die Immunmarkierung wurden die Dünnschnitte wie unter II.5.2.3.5 beschrieben positiv-kontrastiert. Als Negativkontrollen wurden Ansätze ohne primären Antikörper bzw. Ansätze mit Präimmunserum an Stelle des primären Antikörpers mitgeführt. Nach dem letzten Waschschrift erfolgte eine Lufttrocknung der Präparate.

Schritt	Lösung	Dauer
Absättigung von Aldehyden	PBS-Glycin 0.1 % (w/v)	5 min
Blockieren	PBS-BSA 1 % (w/v)	5 min
Primäre Antikörpermarkierung (1° AK)	AK verdünnt in PBS-BSA 0.1 % (w/v)	45 – 60 min
Waschen	PBS-BSA 0.1 % (w/v)	5 x 2 min
Sekundäre Antikörpermarkierung (2° AK)	AK verdünnt in PBS-BSA 0.1 % (w/v)	1 h
Waschen	PBS-BSA 0.1 % (w/v)	5 x 2 min
Waschen	PBS	2 x 2 min
Vernetzung von Epitop, 1° AK und 2° AK	PBS-Glutardialdehyd 2 % (v/v)	5 min
Waschen	PBS	2 x 2 min
Waschen	H <sub>2</sub> O <sub>millipore</sub>	3 x 2 min

**Tabelle 21:** Immunmarkierung an Ultradünnschnitten.

## 9 Molekulargenetische Methoden

### 9.1 Isolierung von DNA

#### 9.1.1 Puffer und Lösungen

<u>XS-Puffer (2-fach; Stocklösung)</u>	Tris/HCl (1 M, pH 7.4)	4 ml
	Ammoniumacetat (7M)	4.56 ml
	EDTA (250 mM)	3.2 ml
	SDS (10 % w/v)	4 ml
	Kaliumethylxanthogenat	0.4 g
	H <sub>2</sub> O (PCR grade)	4.99 ml

#### 9.1.2 DNA-Isolierung nach Tillett und Neilan (2000, mod.)

Zu Beginn der DNA-Extraktion wurde ein Volumen einer Zellsuspension mit gleichem Volumen XS-Puffer gemischt und kurz gevortext. Anschließend erfolgte eine Inkubation für zwei Stunden bei 65 °C wobei das Reaktionsgefäß alle 30 Minuten invertiert wurde. Danach wurde erneut für etwa zehn Sekunden gemischt bevor die Probe für zehn Minuten auf Eis gestellt wurde. Nach dieser Ruhephase erfolgte ein Zentrifugationsschritt für fünf Minuten bei 100 x g und 4 °C. Der resultierende Überstand wurde in ein PhaseLock Gel-Tube (Eppendorf, Hamburg, Germany) überführt, mit dem gleichen Volumen eines Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol-Gemisches (25:24:1) versetzt, vorsichtig vermischt und anschließend zentrifugiert (5 min bei 2000 x g und 15 °C). Die wässrige Phase wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und zur Präzipitation der DNA mit eiskaltem Isopropanol (100 %) und 1/10 Volumen Ammoniumacetat (4 M) gemischt. Dieses Gemisch wurde daraufhin über Nacht bei -20 °C gelagert und darauffolgend für 30 min bei 13600 x g und 4 °C zentrifugiert. Nach dem Waschen des (unsichtbaren) Pellets mit 1 ml eiskaltem Ethanol (70 %) wurde der letzte Zentrifugationsschritt wiederholt und das resultierende Pellet getrocknet und in 15 µl Wasser (*PCR grade*) gelöst.

#### 9.1.3 DNA-Isolierung mit Plasmid-Kit

Neben der DNA-Isolierung nach Tillett und Neilan (2000) mit XS-Puffer wurden zusätzlich kommerzielle Plasmid-Kits von Promega (Promega Corporation, Madison, WI, USA) und

QIAGEN (QIAGEN GmbH, Hilden) verwendet. Dabei wurde nach der jeweils beiliegenden Anleitung vorgegangen.

## 9.2 Bestimmung der DNA-Konzentration

Konzentrationen von DNA-Lösungen (II.9.1.2) wurden photometrisch mit Hilfe eines Nanoliter-Spektralphotometers (NanoDrop ND-1000, Peqlab, Erlangen) bestimmt. Bei DNA-Aufreinigung mit einem 260/280 nm Wert unter 1.8 wurde die DNA Isolierung wiederholt.

## 9.3 Agarose-Gelelektrophorese

### 9.3.1 Elektrophorese- und Probenpuffer

<u>TAE-Puffer</u>	Tris/Acetat, pH 8.0	10 mM
	EDTA	0.1 mM

<u>Probenpuffer (5x)</u>	Ficoll 400	15 % (w/v)
	Na <sub>2</sub> EDTA	0.1 mM
	SDS	0.5 % (w/v)
	BPB	0.125 % (w/v)

pH-Wert stellt sich automatisch auf 8.0 ein

### 9.3.2 Gelelektrophorese

Die Auftrennung von DNA-Lösungen erfolgte auf 1%igen (w/v in TAE-Puffer) Agarosegelen, inklusive 20 µl einer Ethidiumbromidlösung (1 mg/ml (w/v) in H<sub>2</sub>O<sub>millipore</sub>).

Die DNA-Proben wurden im Verhältnis 4:1 (v/v) mit Probenpuffer versetzt und ebenso wie ein passender DNA-Marker (II.1.3) in die Taschen des Agarosegels pipettiert. Als Positivkontrolle wurde genomische DNA von *Bacillus atrophaeus* und als Negativkontrolle steriles Wasser anstatt DNA eingesetzt. Die Auftrennung der DNA im elektrischen Feld erfolgte für 90 min bei 120 V (Biometra Standard Power Pack P25; Biometra, Göttingen). Kontrolliert und dokumentiert wurden die Agarosegele auf einem UV-Leuchtschirm.

## 9.4 Aufreinigung der DNA aus Agarosegelen

Um DNA-Fragmente aus dem Agarosegel zu präparieren, wurden die entsprechenden DNA-Banden mit einem Skalpell unter UV-Licht aus dem Agarosegel ausgeschnitten und mit Hilfe eines e.Z.N.A.<sup>TM</sup> Gel Extraktion Kits (Omega Bio-Tek, Inc., Norcross, USA) entsprechend den Vorgaben des Herstellers aus den Agaroseblöckchen extrahiert.

## 9.5 Polymerase-Kettenreaktion

Die Polymerase-Kettenreaktionen (PCR; Mullis und Faloona, 1987) nach Saiki *et al.* (1985; 1988) wurde in 0.2 ml Eppendorf-Reaktionsgefäßen in einem Eppendorf Mastercycler<sup>®</sup> gradient (Eppendorf AG, Hamburg) oder einem BIO-RAD MyCycler<sup>TM</sup> thermal cycler (Bio-Rad Laboratories GmbH, München) durchgeführt. In jedem Lauf wurden eine Nullkontrolle ohne DNA und eine Positivkontrolle mit genomischer DNA von *B. atrophaeus* mitgeführt. Standard-Ansätze für die PCR (20 µl Gesamtvolumen) enthielten folgende Bestandteile:

<u>PCR-Ansatz (20 µl)</u>	PureTaq Reaktionspuffer Y (incl. MgCl <sub>2</sub> )	2.0 µl
	dNTP-Mix, je 2.5 mM	0.5 µl
	Forward Primer	1.0 µl
	Reverse Primer	1.0 µl
	Pure Taq DNA-Polymerase	0.125 µl
	DNA (100 ng)	~1 µl
	H <sub>2</sub> O (Lichrosolv)	14.38 µl

Dabei wurde, wenn nicht anderweitig angegeben das unten angeführte PCR-Programm verwendet. Die Annealing Temperatur variierte zwischen 60°C und 67°C je nach Primerpaar; dies wurde bereits beim Design der Primer mit berücksichtigt. Für die Amplifizierung der 16S rRNA Gene lag die Annealing Temperatur bei 60 °C. Obwohl die Schmelztemperaturen  $T_m$  für die beiden Primerpaare Afe\_2303\_fw/rev (66 °C/ 65 °C) und Acaldus\_Slp\_fw/rev (je 67 °C) an sich deutlich höher lagen, wurde auch hier das PCR-Programm aus Tabelle 22 bei einer (Annealing Temperatur von 60 °C) verwendet. Erste Tests wurden an genomischer DNA des Isolates SP5/1 mit Afe\_2303\_fw/rev sowie am Isolat HV2/2 mit Acaldus\_Slp\_fw/rev vorgenommen. Als Gegenprobe für die Spezifität setzte man DNA des Stammes SP5/1 zusammen mit dem Primerpaar Acaldus\_Slp\_fw/rev ein sowie eine Nullkontrolle ohne DNA mit dem Primerpaar Afe\_2303\_fw/rev.

PCR-Programm (16S rRNA)		Temperatur	Zeit
Initiale Denaturierung		95 °C	4 min
33 Zyklen	Denaturierung	95 °C	50 sec
	Annealing	60 °C	50 sec
	Elongation	72 °C	120 sec
Finale Elongation		72 °C	10 min

**Tabelle 22:** PCR-Programm für die Amplifizierung der 16S rRNA und S-Layer Gene.

## 9.6 Sequenzierung isolierter DNA und PCR-Produkte

Die Sequenzierung sämtlicher PCR-Produkte wurde durch die Firma Entelechon (Entelechon GmbH, Regensburg) durchgeführt.

## 9.7 Sequenzdatenanalyse

Die phylogenetische Position amplifizierter bakterieller rRNA Gene (nach Sequenzierung) wurde anhand öffentlicher Datenbanken vergleichend mit Hilfe des *Blast Tools* (NCBI; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) bestimmt. Für weiterführende Analysen wurde das Softwarepaket ARB (Ludwig *et al.*, 2004) verwendet, mit dessen Hilfe, wie im Folgenden erläutert, ein Sequenz-basierter Stammbaum erstellt wurde.

## 9.8 Erstellen eines Sequenz-basierten Stammbaums

Die Analyse der Sequenzdaten und die Erstellung des Stammbaumes wurde von Dr. Christine Moissl-Eichinger am Lehrstuhl Mikrobiologie von Prof. Dr. Michael Thomm an der Universität Regensburg durchgeführt. Mit Hilfe des Softwarepakets ARB (Ludwig *et al.*, 2004) wurden automatisch ein Alignment erstellt und anschließend manuell überprüft. Dieses wurde zum „*The All-Species Living Tree*“ hinzugefügt und mit mehr als 7000, qualitativ aussagekräftigen Sequenzen bakterieller und archaeeller Typstämme verglichen (August 2010; Yarza *et al.*, 2008). Für einen Vergleich wurden verschiedene phylogenetische Stammbäume erstellt, die auf der Grundlage der Methoden ‚*maximum parsimony*‘, ‚*neighbour-joining*‘ und ‚*maximum-likelihood*‘ in Verbindung mit zwei verschiedenen Filtervarianten (‚*termini*‘ und ‚*bacteria-specific*‘) berechnet wurden. Zusätzlich wurden die Sequenzdaten bei GenBank unter den Nummern HM070043 (Isolat HV2/2) und HM070044 (Isolat SP5/1) hinterlegt. Aktivkulturen der Stämme HV2/2 (DSM 24413) und SP5/1 (DSM

24419) wurden bei der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ) hinterlegt.

## 10 Adhäsionsversuche von Mikroorganismen

### 10.1 Verwendete Oberflächen

Material	Hersteller
Glas (Deckgläschen), 20 x 20 mm	Paul Marienfeld GmbH & Co. KG, Lauda-Königshofen
Glimmer	Plano GmbH, Wetzlar
Gold-Grid, 400 square mesh, Kohle-beschichtet	Plano GmbH, Wetzlar
Holz (Zahnstocher)	Fackelmann GmbH & Co. KG, Hersbruck
Kunststoff (Petrischalen)	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
Pyrit, 3 x 3 x 3 mm	Institut für Geowissenschaften, Universität Kiel

**Tabelle 23:** Verwendete Oberflächen für Adhäsionsversuche von Mikroorganismen.

### 10.2 Inkubationsbedingungen

Um die Adhäsion von Mikroorganismen auf verschiedenen Oberflächen untersuchen zu können, wurde das jeweilige Material dem Medium vor dem Autoklavieren zugegeben (s.a. II.3). Die Anzucht der Mikroorganismen erfolgte unter Optimalbedingungen, (II.4.1), das Wachstum wurde anhand von Zellzahlen lichtmikroskopisch kontrolliert (II.5.1). Nach dem Erreichen der gewünschten Wachstumsdichte (mindestens  $1 \times 10^6$  Zellen/ml) wurden die Oberflächen für die Rasterelektronenmikroskopie präpariert (II.5.3).

### 10.3 Präparation für anschließende Rasterelektronenmikroskopie

Nach Inkubation der zu untersuchenden Oberflächen mit den entsprechenden Mikroorganismen erfolgte eine chemische Fixierung mit 1 % Glutardialdehyd (w/v; Endkonzentration) direkt im Kulturgefäß. Die Entwässerung der Proben erfolgte nach der Hochdurchsatz-Methode (II.5.3.2), für Kontrollexperimente wurde auf die Entwässerung bei Raumtemperatur zurückgegriffen (II.5.3.3). Sämtliche Proben wurden für die weiteren Untersuchungen im Rasterelektronenmikroskop Schwermetall-bedampft (II.5.3.4).

### III Ergebnisse

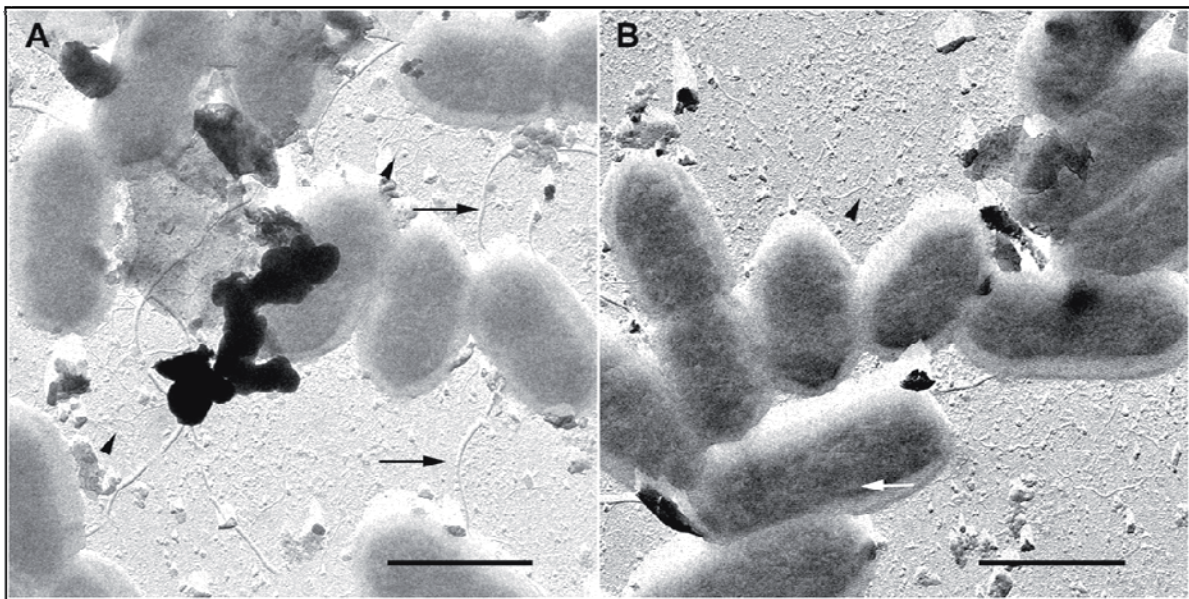
#### 1 Charakterisierung der *Acidithiobacillus*-Stämme HV2/2 und SP5/1

Bei den untersuchten *Acidithiobacillus*-Stämmen HV2/2 und SP5/1 handelt es sich um Eigenisolate von Dr. Harald Huber am Lehrstuhl Mikrobiologie der Universität Regensburg. Der Stamm HV2/2 wurde 1984 aus Probenmaterial, das aus Hveravellier (Island) stammte, isoliert. Aufgrund seiner Morphologie, der Fähigkeit zur Oxidation von Pyrit und Ergebnissen aus der DNA-DNA-Hybridisierung wurde er zunächst als neuen Stamm innerhalb der Spezies *A. ferrooxidans* angesehen. Ebenfalls 1984 erfolgte die Aufreinigung des Isolates SP5/1 aus Proben, die dem italienischen Solfatara-Vulkangebiet (Pisciarelli) entstammten. Das Isolat besaß die morphologische Eigenheit, in Kulturen nach einer gewissen Zeit seine ausgeprägte Stäbchenform zu verlieren und annähernd kokkoide Zellen auszubilden. Deshalb wurde der Stamm SP5/1 bisher unter dem Namen „*Thiobacillus sphaeroides*“ geführt.

Für eine detaillierte Charakterisierung der beiden Isolate HV2/2 und SP5/1 wurden sowohl ihre morphologischen wie auch physiologische Eigenschaften untersucht. Zusätzlich stand im Falle des Stammes SP5/1 eine Labormutante  $\Delta$ Slp90 zur Verfügung, welcher im Verlauf der Arbeit die Fähigkeit verlor, einen S-Layer an der Zelloberfläche auszubilden. Von besonderem Interesse waren diesbezüglich jene Charakteristika, welche sie entweder eindeutig als Stamm einer bereits existierenden Spezies identifizierten oder sie unmissverständlich von diesen unterschied. Hierzu war es nötig, sie mit den bereits beschriebenen Typstämmen *A. ferrooxidans* (Temple und Kolmer, 1951), *A. thiooxidans* (Waksman und Jaffe, 1922), *A. caldus* (Hallberg und Lindström, 1994) und *A. ferrivorans* (Hallberg *et al.*, 2010) zu vergleichen. Dabei wurde insbesondere auf die Bestimmung der optimalen Wachstumsbedingungen und der metabolisch verwertbaren Substrate Wert gelegt. Zusätzlich zu den in dieser Arbeit gewonnen Erkenntnissen wurde mit freundlicher Genehmigung von Harald Huber auf bereits vorliegende Daten (Huber, 1987) zurückgegriffen. Ein Großteil der morphologischen Daten wurde bereits in Klingl (2007) präsentiert und konnte in der vorliegenden Arbeit erneut bestätigt werden. Da sie für eine abschließende und vergleichende Charakterisierung essentiell sind, wurden sie zum Teil unter II.1.1 erneut aufgeführt und entsprechend gekennzeichnet.

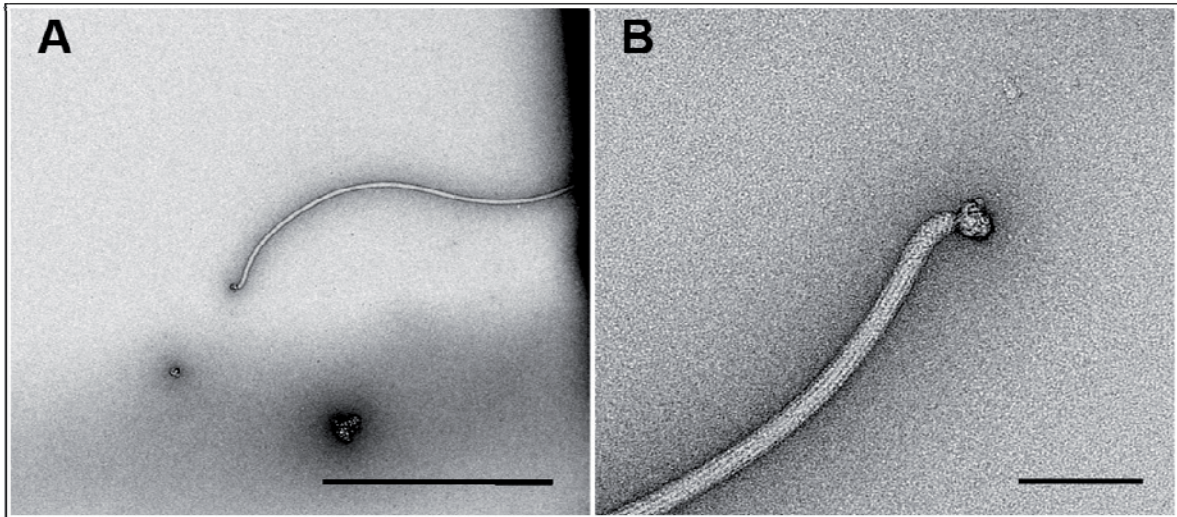
## 1.1 Morphologische Charakterisierung

Sowohl beim Stamm HV2/2 wie auch bei SP5/1 handelte es sich um stäbchenförmige, Gram-negative Bakterien mit einer Länge von 0.8 bis 1.5  $\mu\text{m}$  und einem Durchmesser von 0.5 (Stamm SP5/1) bis 0.7  $\mu\text{m}$  (Stamm HV2/2). Bei sich teilenden Zellen wurde mitunter eine Länge von bis zu 2.5  $\mu\text{m}$  gemessen. Sofern Zell-schonende Präparationsmethoden angewendet wurden, welche keine Zentrifugationsschritte bzw. eine vorsichtige Zentrifugation beinhalteten, konnte für 25 bis 30 % der Bakterien eine einzelne Flagelle sowie deutlich dünnere Zellanhänge, bei denen es sich aufgrund eines Durchmessers von 6 bis 7 nm vermutlich um Pili handelt (Abbildung 4).



**Abbildung 4:** Suspensionspräparate des Isolates SP5/1, präpariert nach II.5.2.1. (A) Die Zellen weisen sowohl Flagellen (schwarze Pfeile) als auch Pili (schwarze Pfeilspitzen) auf. (B) Der Streifen-förmige S-Layer ist schwach erkennbar (weiße Pfeile). Balken: 1  $\mu\text{m}$ .

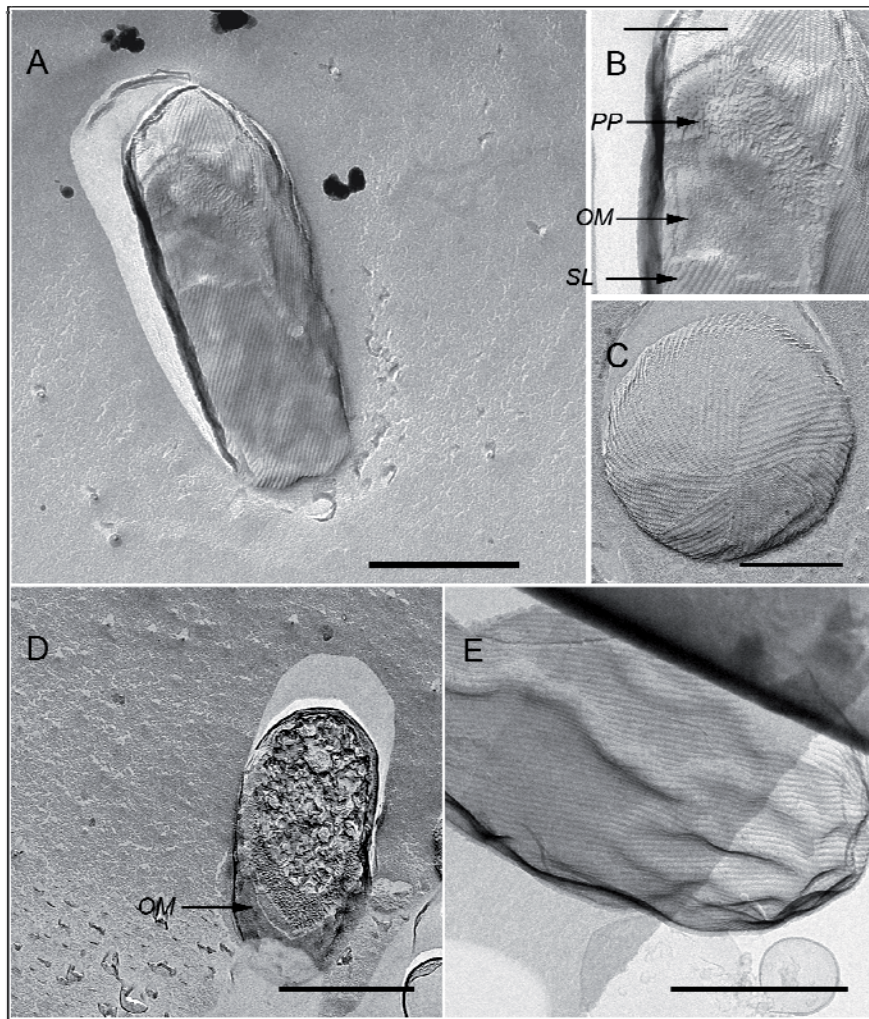
Durch Die Insertionsstelle der Flagelle lag dabei immer in der Nähe des Zellpols und sie wies einen für Bakterien typischen Durchmesser auf: 15 bis 17 nm bei HV2/2 und 18 bis 20 nm bei SP5/1. Zusätzlich gelang für den Stamm SP5/1 die Darstellung der Hakenregion, die sich deutlich vom Rest der Flagelle durch das Fehlen des Streifenmusters in Längsrichtung unterscheidet (Abbildung 5). Die knopfartige Struktur am basalen Ende der Flagelle ließ keinen klaren Schluss über ihre Identität zu. Sie dürfte vermutlich aber den Rest eines Flagellenmotors zeigen, wie er bei anderen Bakterien beschrieben ist (Pallen und Matzke, 2006).



**Abbildung 5:** Suspensionspräparate einer Flagelle (A) des Isolates SP5/1, präpariert nach II.5.2.1. (B) Darstellung der Hakenregion der Flagelle aus (A). Negativkontrastierung mit UAc. Balken: 500 nm (A) bzw. 100 nm (B).

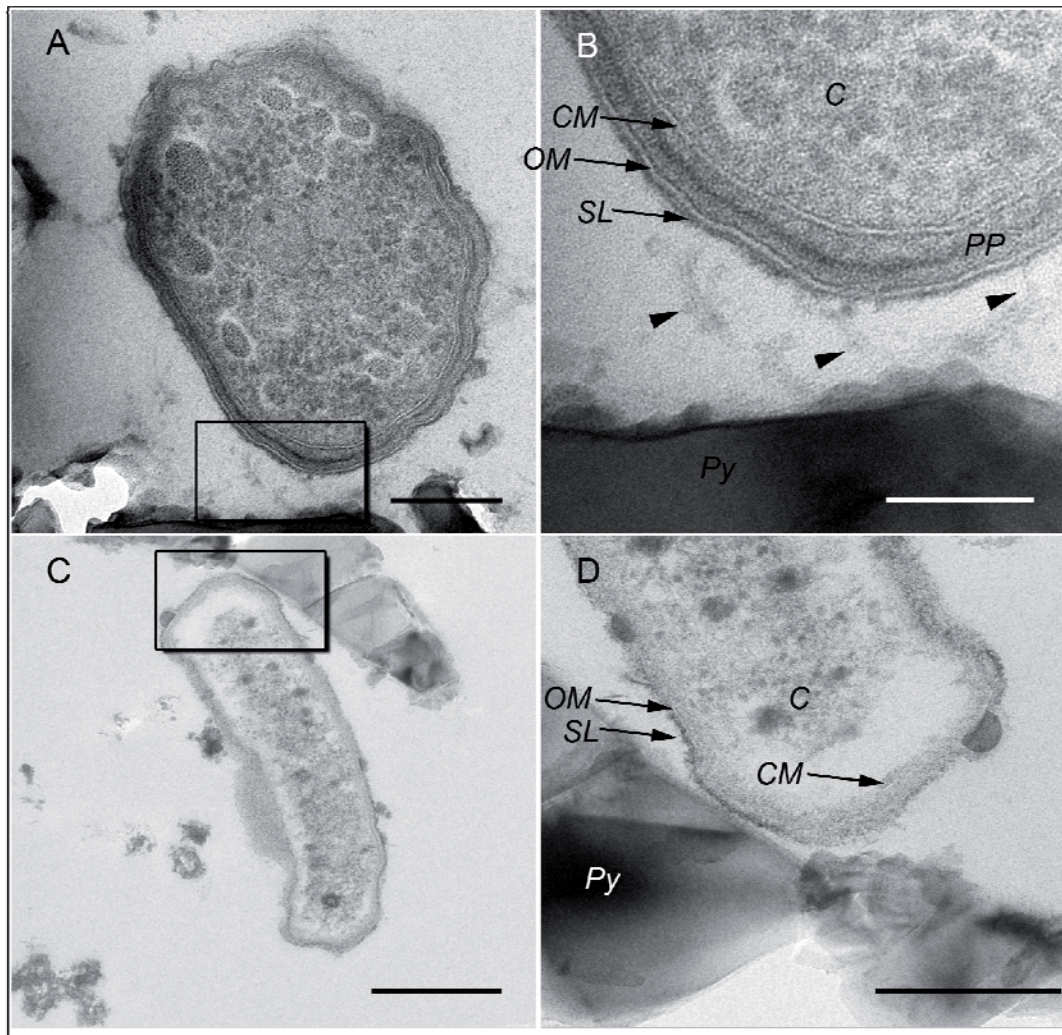
Mit Hilfe der Gefrierätzmethode (II.5.2.2) gelang es, einen Eindruck von der Zelloberfläche zu gewinnen. Sowohl der Stamm HV2/2 wie auch SP5/1 offenbarten ein streifen-förmiges Muster an der Oberfläche. Dies ist typisch für einen S-Layer mit p2-Symmetrie. Die durch diese spezielle Symmetrie zu beobachtenden Streifen konvergierten allesamt zu den beiden Zellpolen hin (Abbildung 6).

Für die Darstellung des S-Layers des Isolates HV2/2 war es nötig, der Kryofixierung durch LN<sub>2</sub> eine chemische Fixierung mit Glutardialdehyd voranzustellen (Abbildung 6 E). Andernfalls konnte ebenso wie für die Labormutante  $\Delta$ Slp90 lediglich eine glatte Oberfläche dargestellt werden, bei der es sich vermutlich um die äußere Membran handelte. Im Gegensatz zum S-Layer defizienten Stamm  $\Delta$ Slp90, war der stäbchenförmige Charakter beim Wildtyp SP5/1 sowie bei HV2/2 deutlich ausgeprägter (Abbildung 6 D).



**Abbildung 6:** TEM Aufnahmen von Gefrierätzungen (II.5.2.2) an Zellen des Isolates SP5/1 (A-C), der S-Layer-defizienten Mutante  $\Delta$ Slp90 (D) und dem Isolat HV2/2. (A) Streifenförmiger S-Layer mit p2-Symmetrie auf der Zelloberfläche von SP5/1. (B) Detailaufnahme, die den S-Layer (SL), die darunterliegende äußere Membran (OM) und vermutlich das Periplasma (PP) zeigt. (C) Zellpol von eines Vertreters des Stammes SP5/1. (D)  $\Delta$ Slp90 mit der äußeren Membran (OM) als äußerste Zellwandkomponente. (E) Isolat HV2/2. Balken: 500 nm (A, D, E) und 200 nm (B, C).

Anhand von Ultradünnschnitten an hochdruckgefrorenen, gefriersubstituierten und in Epon<sup>®</sup> 812 eingebetteten Proben (II.5.2.3) konnten die Dicken und Abmessungen der einzelnen Zellkompartimente bestimmt werden (Abbildung 7). In beiden Organismen konnten cytoplasmatische Einschlüsse mit einem Durchmesser von 50 bis 70 nm beobachtet werden; beim Stamm HV2/2 wurden in Ausnahmefällen sogar Durchmesser bis zu 110 nm gemessen. Das Cytoplasma war bei beiden Bakterien von einer etwa 4.5 nm dicken Cytoplasmamembran umgeben. Es folgt ein Periplasma mit dem darin enthaltenen Peptidoglycan, welches eine Weite von 14 nm beim Isolat SP5/1 und 21 bis 28 nm bei HV2/2 aufwies. Das Periplasma war seinerseits von einer äußeren Membran mit 4.5 bis 5 nm Dicke umgeben. Dieser äußeren Membran war der S-Layer aufgelagert, bei dem die Dicke des kontrastreichen Proteinanteils im Dünnschnitt zwischen 5 und 10 nm lag.



**Abbildung 7:** Ultradünnschnitte hochdruckgefrorener und in Epon eingebetteter Zellen der Isolate HV2/2 (A) und SP5/1 (C) entsprechend der Vorgehensweise unter II.5.2.3. Als Substrat wurde Pyrit verwendet (II.2.2.1). (B) und (D): Vergrößerte Darstellung der markierten Bereiche in (A) und (C). Py: Pyrit; C: Cytoplasma; CM: Cytoplasmamembran; PP: Periplasma mit Peptidoglykan; OM: äußere Membran; SL: S-Layer; Pfeilspitzen: Filamentöse Oberflächenstruktur. Balken: 500 nm (C), 200 nm (A, D) und 100 nm (B).

Eine Computer-gestützte Korrelationsmittelung (II.5.2.6) der aufgereinigten und negativ-kontrastierten S-Layer-Proteine (II.7.2.2) ergaben beinahe identische Gitterkonstanten für die Stämme HV2/2 und SP5/1. Ihre Werte sowie eine Zusammenfassung aller weiteren bereits genannten morphologischen Daten sind in der folgenden Tabelle zusammengefasst.

Organismus	HV2/2	SP5/1
Zellgröße	1-2.5 x 0.7 µm	0.8-1.5 x 0.5 µm
Flagellen (Ø)	15-17 nm	18-20 nm
Pili (Ø)	6-7 nm	6-7 nm
Zelluläre Strukturen		
Innere Membran <sup>a</sup>	4.5 nm	4.5 nm
Periplasma <sup>a</sup>	21-28 nm	14 nm
Äußere Membran <sup>a</sup>	4.5 nm	5 nm
Cytoplasmatische Einschlüsse (Ø)	50-110 nm	50-70 nm
S-Layer <sup>a</sup>	5-8 nm	8-10 nm
Symmetrie <sup>a,b,c</sup>	p2	p2
Gittervektor a <sup>c</sup>	16.1 nm	15.6 nm
Gittervektor b <sup>c</sup>	6.3 nm	6.4 nm
Zwischenliegender Winkel α <sup>c</sup>	81.3 °	82.0 °

**Tabelle 24:** Morphologische Eigenschaften der Isolate HV2/2 und SP5/1.

Ø Durchmesser

a Ultradünnschnitte

b Gefrierätzung

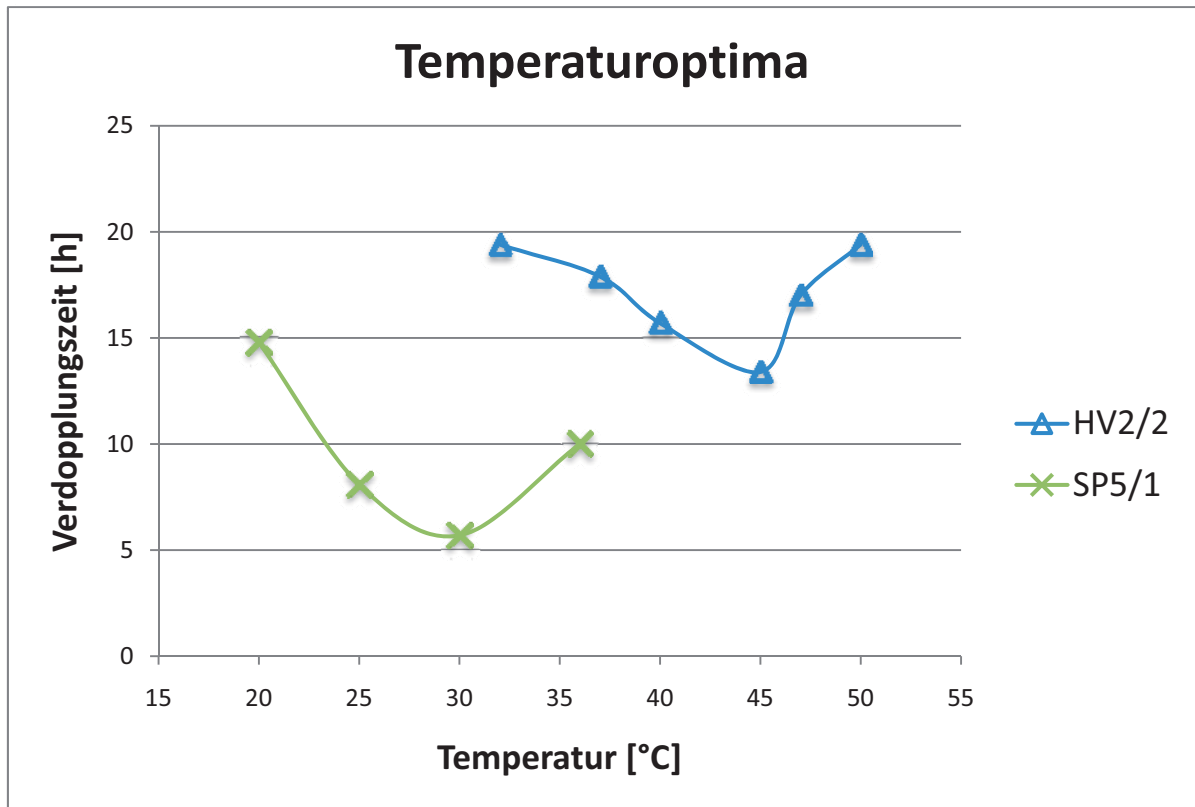
c Korrelationsmittelung

## 1.2 Bestimmung der optimalen Wachstumsbedingungen

Bezüglich der Ergebnisse aus der Analyse der 16 S rRNA Gensequenzen (III.1.5) wurde für das Isolat HV2/2 eine hohe Übereinstimmung mit *A. caldus* DSM 8584<sup>T</sup> festgestellt. Aus diesem Grund wurde die Bestimmung der optimalen Wachstumstemperatur gezielt im mesophilen und moderat thermophilen Bereich vorgenommen. Ausgeführt wurden die Versuche in dreifacher Ausfertigung jeweils in 9k- Medium (pH2.5). Bei der Verwendung von 1 % S<sup>0</sup> und 0.1 % Trypton als Substrat konnte für den Stamm HV2/2 eine minimale Verdopplungszeit von 13.4 h bei einer Temperatur von 45 °C festgestellt werden. Der Bereich, in dem Wachstum nachweisbar war, erstreckte sich von 32 bis 50 °C (Abbildung 8). Außerhalb dieses Temperaturbereichs waren auch nach 11 Tagen Inkubation keine Zellen unter dem Lichtmikroskop zu sehen. Darüber hinaus ergab sich für ein optimales Zellwachstum ein pH-Wert von 2.5 wobei im Allgemeinen ein Wachstum zwischen pH 1.5 und 3.5 möglich war.

Die Werte für die Ermittlung der optimalen Wachstumstemperatur des Stammes SP5/1 wurden von Harald Huber (Lehrstuhl Mikrobiologie, Universität Regensburg) zur Verfügung gestellt. Für dieses Bakterium konnte Wachstum in einem Temperaturbereich von 20 bis

36 °C nachgewiesen werden (Abbildung 8). Die niedrigsten Verdopplungszeiten betragen 5.7 h auf der Erzmischung G1 und 2.5 h auf FeSO<sub>4</sub>, jeweils bei 30 °C. Weder bei 15 °C noch bei 41 °C konnte ein Zellwachstum festgestellt werden. Der optimale pH-Wert für ein Wachstum des Stammes SP5/1 lag dabei zwischen 2.0 und 2.5 wobei der maximale Bereich zwischen 1.0 und 4.5 lag.



**Abbildung 8:** Bestimmung der optimalen Wachstumstemperatur. Graphische Darstellung der minimalen Verdopplungszeit der Isolate SP5/1 auf G1 und HV2/2 auf Schwefel (1 %) und Trypton (0.1 %) in Abhängigkeit von der Temperatur.

### 1.3 Substratspektrum

Die Ermittlung des Substratspektrums erfolgte, wie auch bei der Bestimmung des Temperaturoptimums, in dreifacher Ausfertigung in 9k-Medium (pH 2.5) und bei der optimalen Wachstumstemperatur des jeweiligen Stammes (Tabelle 9; II.4.1). Bei den getesteten Substraten zeigte der Stamm HV2/2 das beste Wachstum auf Schwefel mit Zelldichten über  $5 \times 10^8$  Zellen pro ml. Sehr gutes Wachstum konnte auf Schwefel in Verbindung mit Trypton, Glucose oder Hefeextrakt, auf Pyrit bzw. den Erzmischungen G1 G1N oder G6 und auf FeSO<sub>4</sub> dokumentiert werden. Des Weiteren konnten auch „Knallgas“ oder Tetrathionat kombiniert mit Hefeextrakt bzw. Glukose als Energiequellen verwendet werden. Die bei der Inkubation mit Glukose oder Thiosulfat beobachteten Zellen sind aller Wahrscheinlichkeit nach als Artefakte aus dem Animpfen zu betrachten. Weder auf Na<sub>2</sub>S,

anaerob auf  $\text{Fe}^{3+}$ , organotroph auf Hefeextrakt bzw. Trypton noch beim Versuch zur Fixierung atmosphärischen Stickstoffs wurde ein Wachstum festgestellt.

Neben Pyrit, den Erzmischungen G1, G1N und G6 sowie  $\text{FeSO}_4$  führten auch Schwefel und Thiosulfat zu einem sehr guten Wachstum beim Isolat SP5/1 mit Zellzahlen über  $10^9$  pro ml auf Pyrit oder  $\text{FeSO}_4$ . Neben einem Wachstum auf „Knallgas“ war der Stamm SP5/1 auch in der Lage, anaerob auf  $\text{Fe}^{3+}$  zu wachsen und atmosphärischen Stickstoff zu fixieren. Da weder  $\text{Na}_2\text{S}$  noch organische Substrate wie Hefeextrakt verstoffwechselt wurden, kann für SP5/1 ebenso wie für HV2/2 auf ein lithotrophes Wachstum mit anorganischen Substraten geschlossen werden. Eine Zusammenfassung der Ergebnisse findet sich in Tabelle 25.

Substrate	HV2/2	SP5/1
$\text{S}^0$	++ <sup>a</sup>	++
$\text{S}^0$ + Try	++ <sup>a</sup>	n.d.
$\text{S}^0$ + YE	++	n.d.
$\text{S}^0$ + Glc	++	n.d.
Pyrit	++	++ <sup>a</sup>
G1	++	++
G1N	++	++
G6	++	++
$\text{FeSO}_4$	++	++ <sup>a</sup>
$\text{H}_2/\text{O}_2$	+	+
$\text{S}_4\text{O}_6^{2-}$ + YE	+	n.d.
$\text{S}_4\text{O}_6^{2-}$ + Glc	+	n.d.
Glc	0	n.d.
$\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$	0	++ <sup>b</sup>
$\text{H}_2/\text{CO}_2$ + $\text{Fe}^{3+}$	-	++
$\text{Na}_2\text{S}$	-	-
YE	-	- <sup>b</sup>
Try	-	n.d.

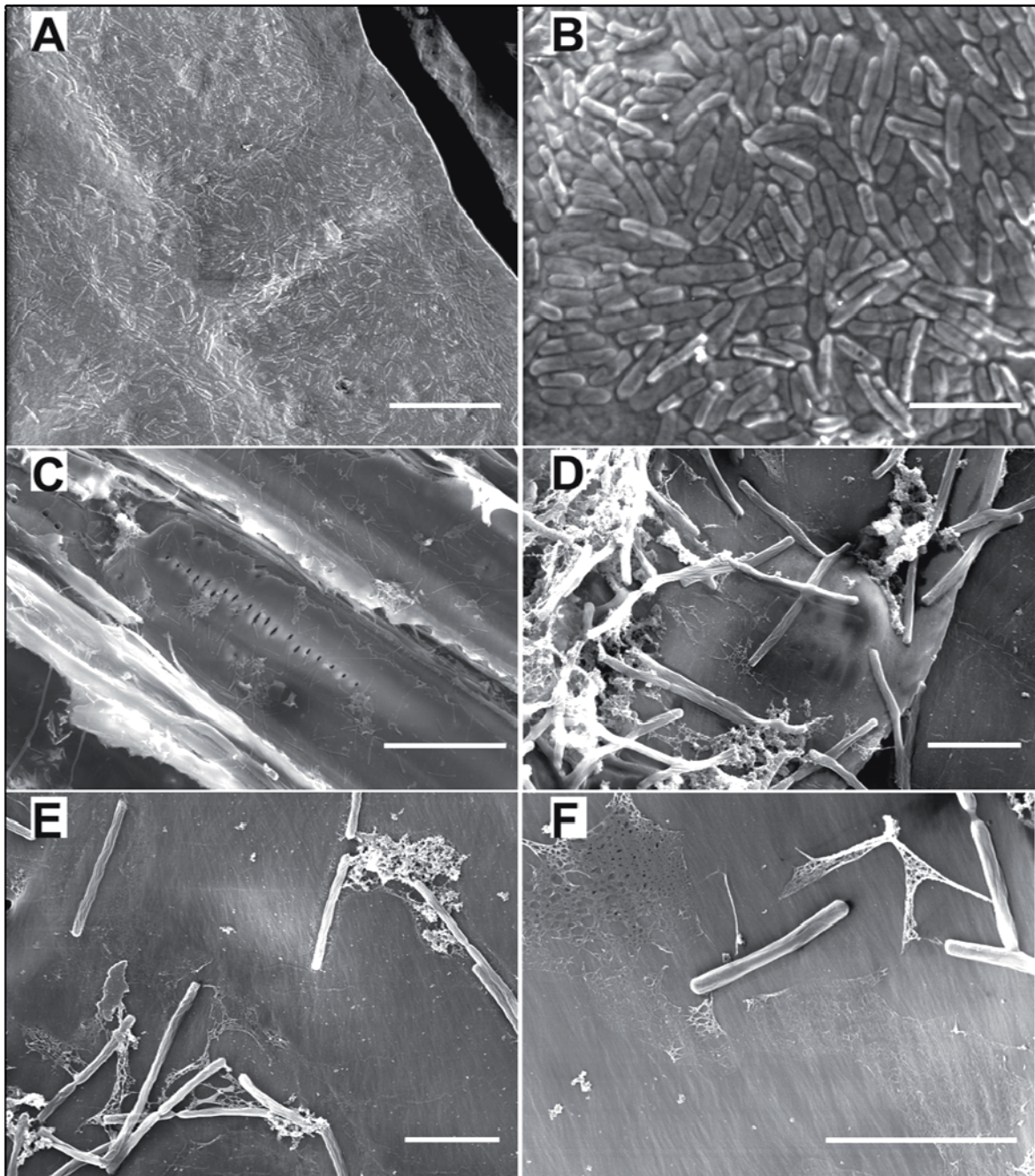
**Tabelle 25:** YE, Hefeextrakt; Try, Trypton; Glc, Glucose;  $\text{H}_2/\text{O}_2$ , „Knallgas“ (1 bar  $\text{H}_2$  auf einer Gasphase mit  $\text{N}_2/\text{O}_2$  80:20);  $\text{H}_2/\text{CO}_2$  (80:20, 250 kPa, aerob). ++ gutes Wachstum, + Wachstum, 0 Zellen sichtbar aber möglicherweise Artefakte durch Animpfen, - kein Wachstum, n.d. nicht bestimmt. <sup>a</sup> mehr als  $5 \times 10^8$  Zellen pro ml; <sup>b</sup> Huber (1987).

## 1.4 Adhäsionsversuche und Motilität

### 1.4.1 Etablierung neuer Trocknungsverfahren für die Rasterelektronenmikroskopie

Um in der Rasterelektronenmikroskopie eine möglichst hohe Auflösung bei der Bildgebung zu erreichen, war es wichtig, die Präparation der Zellen als limitierenden Faktor soweit wie möglich zu optimieren. Ein entscheidender Punkt war hierbei eine adäquate Dehydratisierung der Proben, um potentiell nachträglichen Entwässerung und Formveränderungen der Zellen im Hochvakuum zu verhindern, was Aussagen über Vorkommen und Erscheinungsbild feiner und diffiziler Zellstrukturen wie Flagellen, Pili oder das regelmäßige Gitter des S-Layers erschweren könnte.

Eine gute Strukturhaltung lieferte hierbei die Dehydratisierung der Proben nach der Standardmethode (siehe II.5.3.1). Obwohl diese Methode sogar die Präparation kompletter Kolonien von *Paenibacillus uliginosus* auf Agarplatten ermöglichte (Abbildung 9 A, B), war die geringe Anzahl an Proben, die gleichzeitig bearbeitet werden konnten auf drei bis vier begrenzt. Aus diesem Grunde war es erforderlich, weitere Methoden zu entwickeln, die die Handhabung großer Probenzahlen ermöglichte. Eine hierfür entwickelte Hochdurchsatzmethode (II.5.3.2), bei der die Proben in der Gefriertrocknungsanlage BETA 1-16 anstatt in der Hochvakuum-Bedampfungs- und Gefrierätzanlage gefriergetrocknet wurden. Dieses stellte einen Kompromiss zwischen optimaler Strukturhaltung und schneller Präparation vieler Proben dar. Auch wenn letztere mit dieser Methode deutlich schlechter war als bei der Standardmethode, ermöglichte sie dennoch die Darstellung von Zellanhängen bei *M. kandleri* (Abbildung 9 D) oder von *S. solfataricus* P2 (Abbildung 44). Neben der Hochdurchsatzmethode wurde für Experimente, die lediglich eine quantitative Bestimmung adhärenter Zellen auf diversen Oberflächen ermöglichen sollte, die Entwässerung bei Raumtemperatur mit Hilfe von Ethanol in ansteigender Konzentration durchgeführt (II.5.3.3). Trotz der qualitativ schlechten Strukturhaltung der Zellen, bei denen weder Zellanhänge noch der S-Layer zu erkennen waren (vgl. Abbildung 11), erlaubte es diese Methode, die Adhäsion von *Acidithiobacillus* an unterschiedlichen Materialien elektronenmikroskopisch zu untersuchen (Abbildung 13).

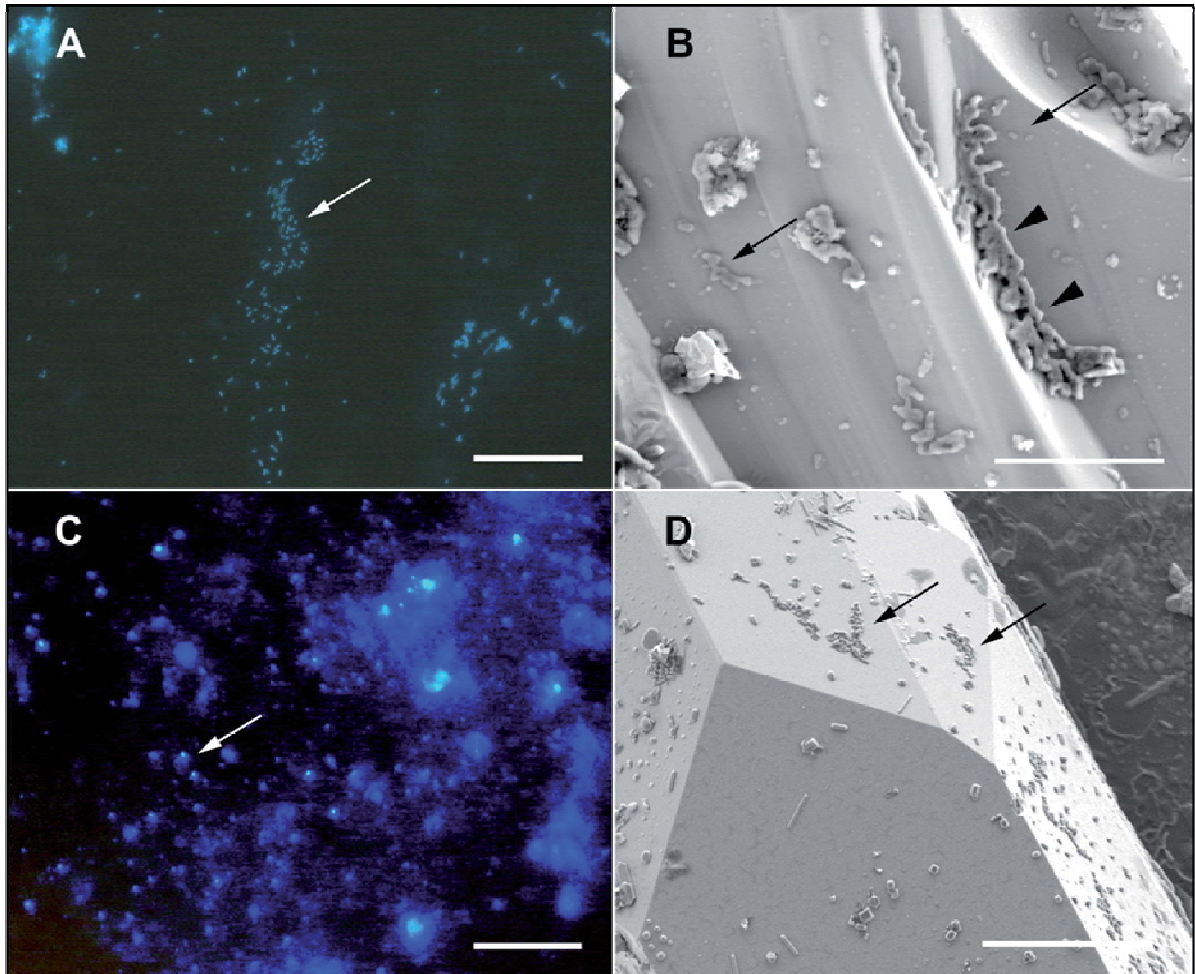


**Abbildung 9:** Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen zur Veranschaulichung unterschiedlicher Trocknungsverfahren. (A) und (B) Kolonie von *P. uliginosus*, gewachsen auf einer Agar-Platte. Gefriertrocknung nach II.5.3.1. (C - F) *M. kandleri* gewachsen auf Holz. Gefriertrocknung nach II.5.3.2. Balken: 50 µm (C), 20 µm (A) und 5 µm (B, D-F).

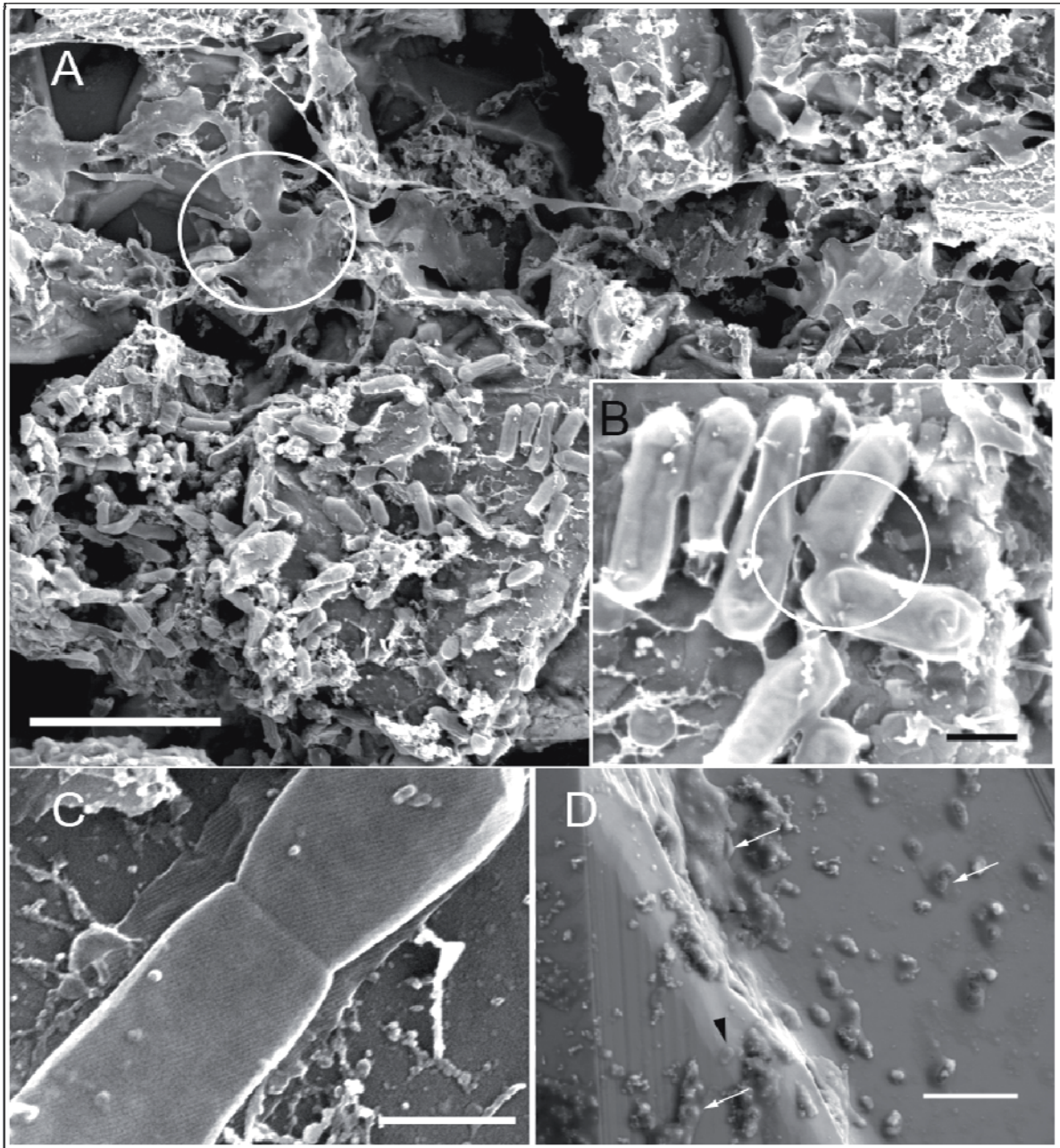
#### 1.4.2 Adhäsion von *Acidithiobacillus* an verschiedene Oberflächen

Die in diesem Zusammenhang durchgeführten Adhäsionsversuche wurden mit den Isolaten HV2/2 und SP5/1 sowie dem Laborstamm  $\Delta$ Slp90 durchgeführt. Die Anheftung aller drei getesteter Stämme an die Oberfläche von Pyritkristallen konnte sowohl ichtmikroskopisch mit

Hilfe einer DAPI-Färbung (II.5.1.3) als auch mit dem Rasterelektronenmikroskop (II.5.3) gezeigt werden. Bei Langzeitversuchen führten Beobachtungen DAPI-gefärbter Zellen unter dem Fluoreszenzmikroskop zu der Erkenntnis, dass im Falle von HV2/2 etwa 95 % und bei SP5/1 etwa 30 % der Zellen auf der Pyritoberfläche adhärten. Hierbei war insbesondere bei letzterem Stamm gelegentlich die Ausbildung einer EPS-ähnlichen Substanz zu beobachten, in welche die Zellen eingebettet zu sein schienen (Abbildung 10 B, Abbildung 11).



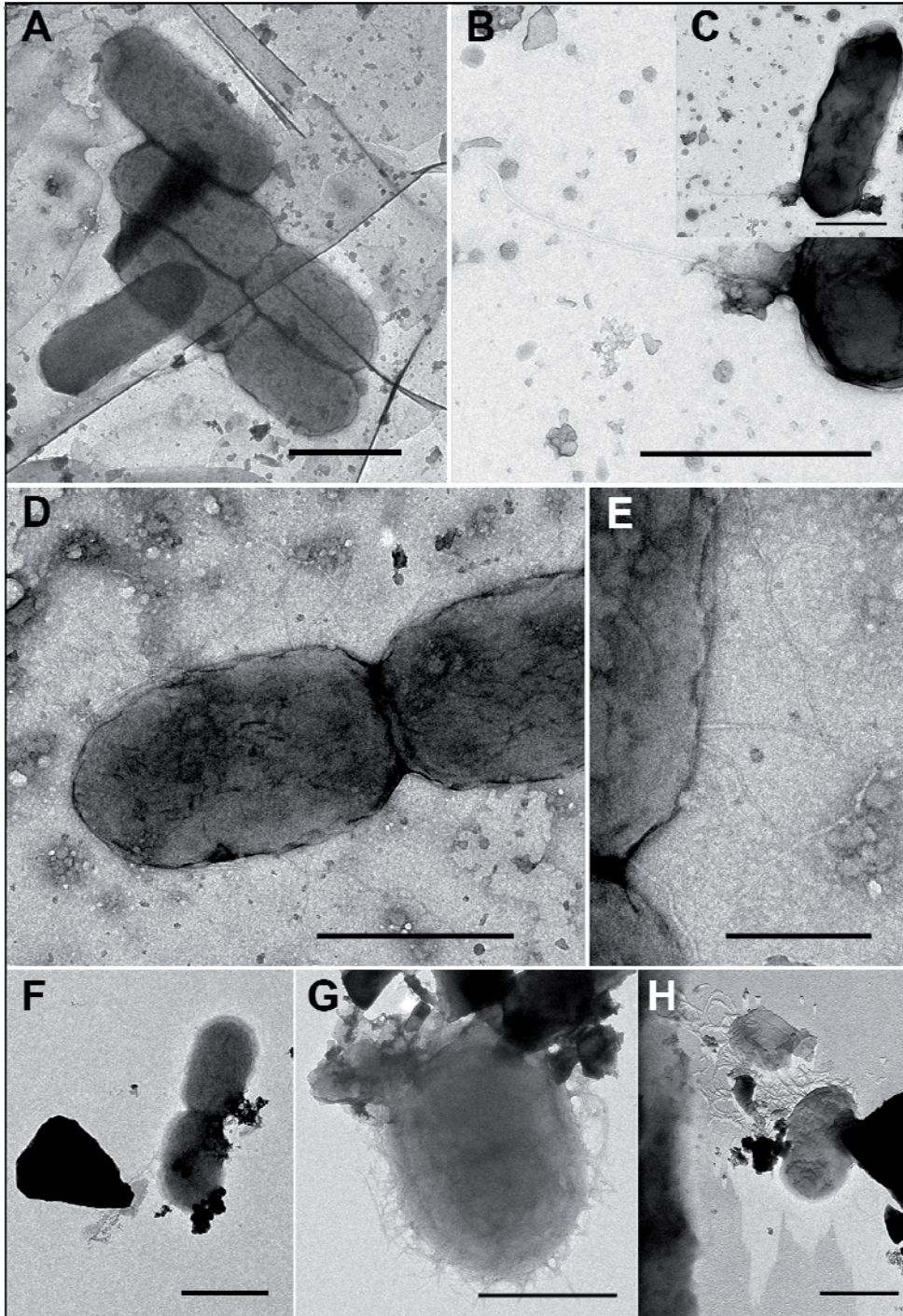
**Abbildung 10:** Adhäsion der Stämme SP5/1 (A, B) und HV2/2 (C, D) an Pyrit. Die Organismen wurden unter Standardbedingungen inkubiert. (A) und (C): Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme DAPI-gefärbter Zellen (weiße Pfeile), entsprechend II.5.1.3. (B) und (D): Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme von Zellen auf Pyritkristallen (schwarze Pfeile) unterschiedlicher Kristallorientierung, teilweise umgeben von EPS (schwarze Pfeilspitzen). Präparation nach II.5.3.1. Balken: je 20 µm.



**Abbildung 11:** Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme des Isolates SP5/1, gewachsen auf Pyrit und entsprechend II.5.3.1 präpariert. Die weißen Kreise in (A) und (B) markieren vermutlich EPS. (C) Bei dieser Art der Präparation ist der streifenförmige S-Layer immer noch sichtbar; mit freundlicher Genehmigung von G. Wanner. (D) Darstellung einzelner freier Zellen (schwarze Pfeilspitzen) und von EPS, in welches die Zellen eingebettet sind (weiße Pfeile). Balken: 5  $\mu$ m (A, D) und 500 nm (B, C).

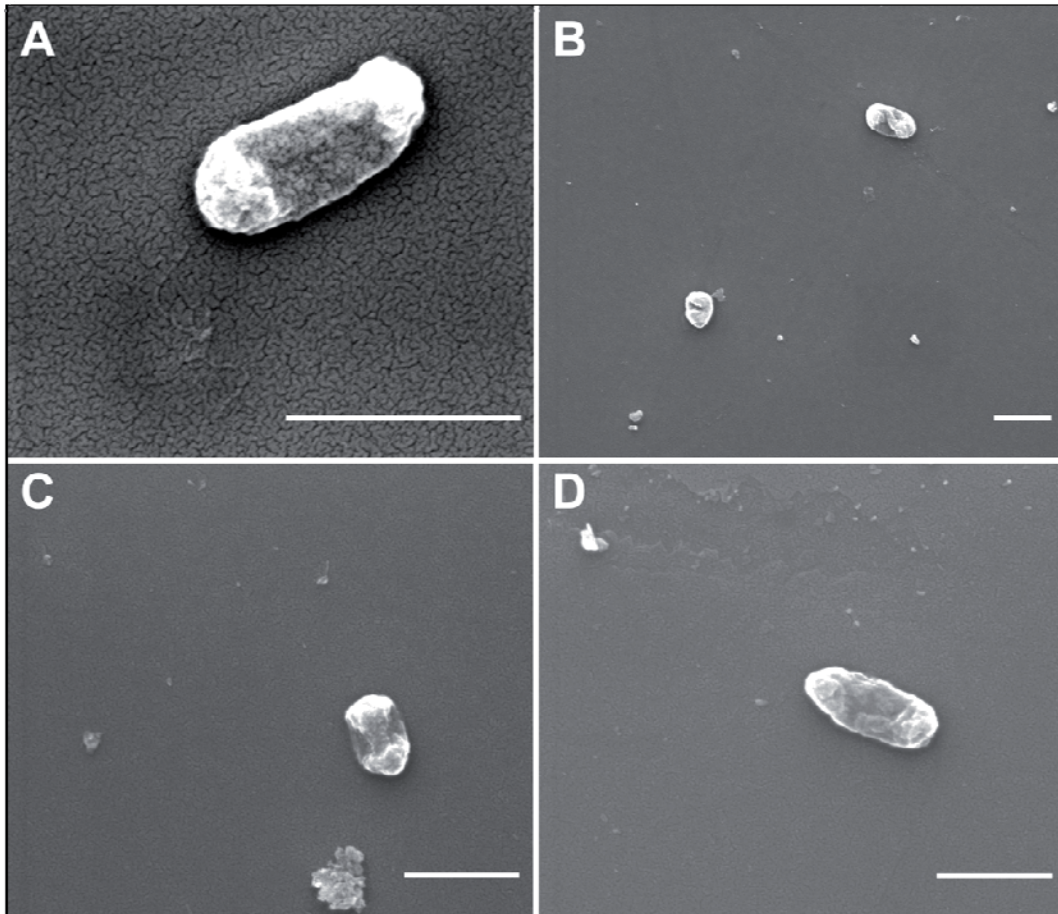
Fehlte diese Substanz, konnte bei stärkerer Vergrößerung auch hier wieder der streifenförmige S-Layer dokumentiert werden. Der Laborstamm  $\Delta$ Slp90 war wie SP5/1 ebenfalls in der Lage, sich an Pyrit anzuheften. Ein Kurzzeitversuch über einen Tag adhärten etwa 90 bis 95 % der Zellen des Stammes SP5/1 verglichen 80 % im Fall von  $\Delta$ Slp90. Der Unterschied war allerdings nicht signifikant genug, um eine Abhängigkeit der Adhäsion vom S-Layer Protein in Betracht zu ziehen. Sowohl für den Stamm HV2/2 wie auch für SP5/1 konnte ein Wachstum auf Kohle-befilmten Goldgrids nachgewiesen werden (Abbildung 12). Neben Flagellen wiesen dabei die Zellen des Stammes SP5/1 auch dünnere,

Pili-ähnliche Zellanhänge mit einem Durchmesser von 6 bis 7 nm auf. Jene Strukturen konnten auch am Isolat HV2/2 beobachtet werden, jedoch in weitaus höherer Zahl (Abbildung 12 G, H). Für den Laborstamm  $\Delta$ Slp90 konnte bisher keine Adhäsion auf Kohle-befilmten Goldgrids dokumentiert werden.



**Abbildung 12:** Suspensionspräparate der Isolate SP5/1 (A–E) und HV2/2 (F–H), gewachsen auf Kohle-befilmten Goldgrids mit Pyrit als Substrat (II.10.1); (A–G) Kontrastierung mit Uranylacetat, (H) Platin/Kohle-Bedampfung (II.5.2.1). Zellteilungsstadien adhärenter Zellen von SP5/1. (B) Vergrößerte Darstellung der Flagelle aus (C). (D) und (E): Pili-artige Zellanhänge an der Zelloberfläche von SP5/1. (F) Zellteilungsstadium von HV2/2. (G) und (H): Pili-artige Zellanhänge an der Zelloberfläche von HV2/2. Balken: 500 nm (A–D, F–H) und 200 nm (E).

Sowohl auf Glas wie auch auf Glimmer konnten vereinzelt Zellen der Stämme SP5/1 und  $\Delta$ Slp90 gefunden werden (Abbildung 13). Jedoch war ihre Anzahl auf diesen Oberflächen derart gering, dass hier, ebenso wie für den Stamm HV2/2, eine gezielte Adhäsion mehr oder weniger ausgeschlossen werden konnte. Vermutlich handelte es sich bei den vorgefundenen Bakterien um planktonische Zellen, welche durch die Trocknung auf der Oberfläche verblieben waren. Für keinen der untersuchten *Acidithiobacillus*-Stämme konnte eine Interaktion mit Holz dokumentiert werden.

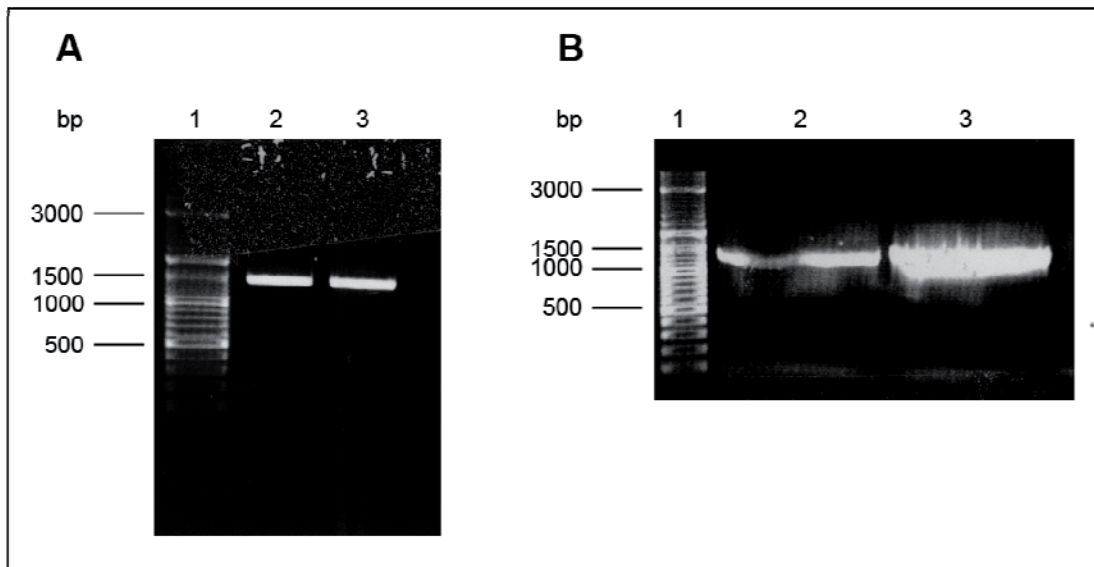


**Abbildung 13:** Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen der Stämme SP5/1 und  $\Delta$ Slp90 auf abiotischen Oberflächen. (A) Stamm SP5/1 auf Glas. (B – D)  $\Delta$ Slp90 auf Glimmer. Die Zellen wurden entsprechend II.5.3.3 bei Raumtemperatur entwässert. Balken: je 1  $\mu$ m.

Sowohl für das Isolat HV2/2 als auch für SP5/1 konnte eine aktive Bewegung der Zellen unter dem Lichtmikroskop (II.5.1.1) beobachtet werden. Die Bewegung schien dabei durch die Rotation der Flagelle zu erfolgen. Eine derartige Rotation wurde mehrmals beim Stamm SP5/1 beobachtet, wenn Zellen mit der Flagelle am Objektträger adhärten. Der Zellkörper drehte sich dabei für einige Sekunden in eine Richtung, um nach einer kurzen Unterbrechung die Drehrichtung der Rotation umzukehren.

## 1.5 Phylogenetische Analyse der Stämme

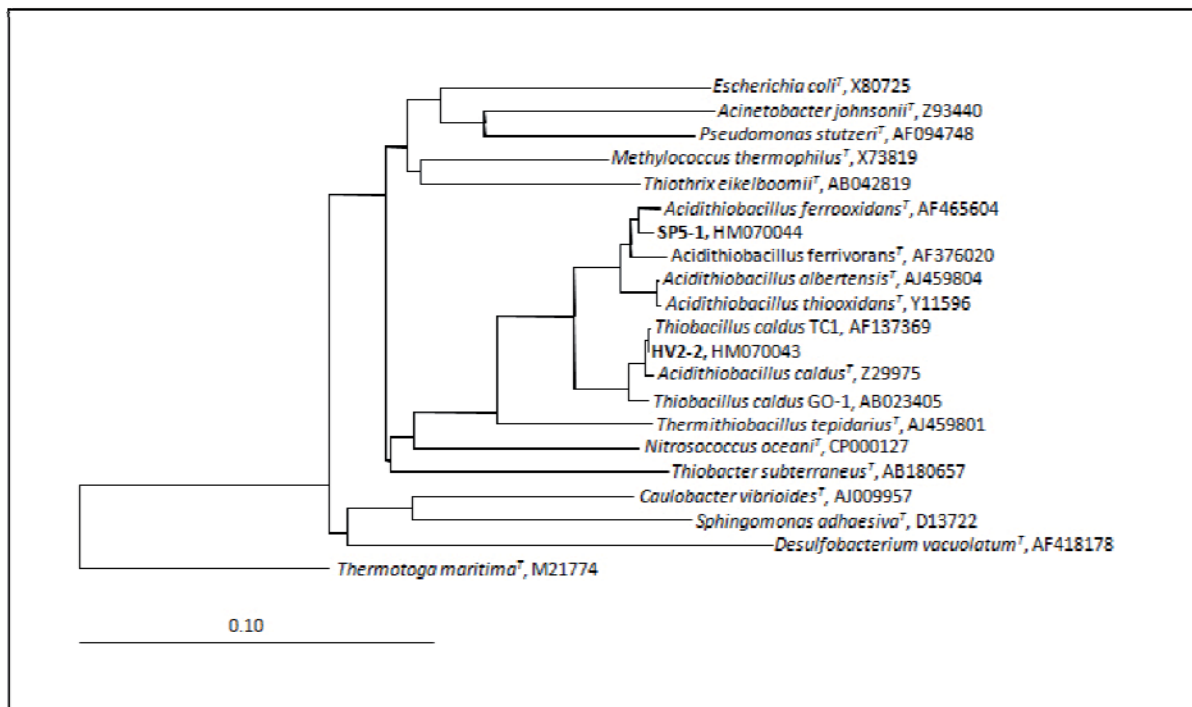
Die Sequenzierung der 16S rRNA Gene mit einer anschließenden Vorabanalyse mittels Blast führte zu der Erkenntnis, dass sowohl der Stamm HV2/2 als auch der Stamm SP5/1 der Gattung *Acidithiobacillus* innerhalb der  $\gamma$ -Proteobakterien angehören.



**Abbildung 14:** Spezifische Amplifikation der 16S rRNA Gene der untersuchten *Acidithiobacillus* Isolate. (A) SP5/1, gewachsen auf  $\text{FeSO}_4$  (Spur 2) bzw. Pyrit (Spur 3). (B) HV2/2, gewachsen auf Pyrit (Spur 2) bzw. Erz Mischung G1N (Spur 3). Spur 1 jeweils Längenstandard. Die DNA-Isolierung und PCR erfolgte entsprechend II.9.1 bzw. II.9.5.

Eine Analyse der vorliegenden Sequenz des Isolates SP5/1 (1297 bp; Abbildung 14 A) mit Hilfe eines *Nucleotide Blasts* zeigte eine hohe Übereinstimmung mit *A. ferrooxidans* ATCC 33020. Neben diesem Stamm wiesen auch noch *A. ferrooxidans* A1, A2 und R2 eine hohe Sequenzübereinstimmung auf. Die genaue phylogenetische Position wurde mit Hilfe der ARB-Software bestimmt. Dabei stellte sich heraus, dass der Sequenzunterschied des Stammes SP5/1 zum Typstamm *A. ferrooxidans* DSM 14882<sup>T</sup> lediglich 0.23 % beträgt, was einem Austausch von drei Basenpaaren entspricht (AF465604; Abbildung 15). Vor dem Hintergrund des Substrat- und Temperaturspektrums von SP5/1 konnte dieser Stamm eindeutig als Vertreter der Spezies *A. ferrooxidans* identifiziert werden. Für den Stamm HV2/2 ergab eine grobe Analyse der 16S rRNA Gensequenz (1304 bp; Abbildung 14 B) mittels *Nucleotide Blast* eine große Ähnlichkeit zu den *A. caldus* Stämmen D-2 und DX-2. Anhand der Ergebnisse der ARB-Sequenzanalyse konnte eine hohe Ähnlichkeit zu *A. caldus* TC1 und ein Unterschied von 1 % bzw. 13 abweichende Basenpaare hinsichtlich des Typstamms *A. caldus* DSM 8584<sup>T</sup> ermittelt werden (Z29975; Abbildung 15). Trotz dieser hohen Übereinstimmung und der Tatsache, dass auch das Temperaturspektrum eine Zugehörigkeit zur Spezies *A. caldus* unterstützen würde, konnten für den Stamm HV2/2

diverse Charakteristika nachgewiesen werden, die ihn als Vertreter einer eigenständigen Spezies darstellen. Als wichtigstes Argument konnte hierzu seine Fähigkeit zur Oxidation von Metallsulfiden wie Pyrit und Chalkopyrit und von  $\text{FeSO}_4$  gezeigt werden. Zusätzlich können für *A. caldus* nachgewiesen Substrate wie Glucose, Thiosulfat und Natriumsulfid vom Stamm HV2/2 nicht als Energiequelle genutzt werden. Des Weiteren wies dieses Bakterium einen bisher unbekanntem, streifenförmigen S-Layer auf, sowie ein Temperaturoptimum von 45 °C.



**Abbildung 15:** Phylogenetische Stammbaum zur Einordnung der Stämme SP5/1 und HV2/2 basierend auf ihrer jeweiligen 16S rRNA Gensequenzen. Als Referenzen dienten unter anderem die Typstämme von *A. ferrooxidans* (AF465604), *A. thiooxidans* (Y11596), *A. ferrivorans* (AF376020) und *A. caldus* (Z29975). Der Stammbaum wurde entsprechend II.9.8 nach der ‚neighbour joining‘ Methode berechnet. Als Outgroup diente *Thermotoga maritima*<sup>T</sup>.

## **2 Charakterisierung des S-Layer Proteins aus dem *Acidithiobacillus*-Isolat SP5/1**

Wie bereits in Klingl (2007) gezeigt werden konnte, sind die zu den  $\gamma$ -Proteobakterien gehörenden, Gram-negativen Isolate HV2/2 und SP5/1 von einem regelmäßig angeordneten S-Layer mit p2-Symmetrie bedeckt. Ein Ziel dieser Arbeit war es, dieses Oberflächenprotein eingehender zu charakterisieren und mögliche Funktionen zu ermitteln. Auch sollte ein möglicher Zusammenhang zu einem bereits früher erwähnten 92 kDa Protein (Mjoli und Kulpa, 1988) oder einer extrazellulären, polymeren Substanz, kurz EPS (Sand und Gehrke, 2006), geklärt werden.

### **2.1 Identifikation des S-Layers und weiterer dominierender Proteine der äußeren Membran**

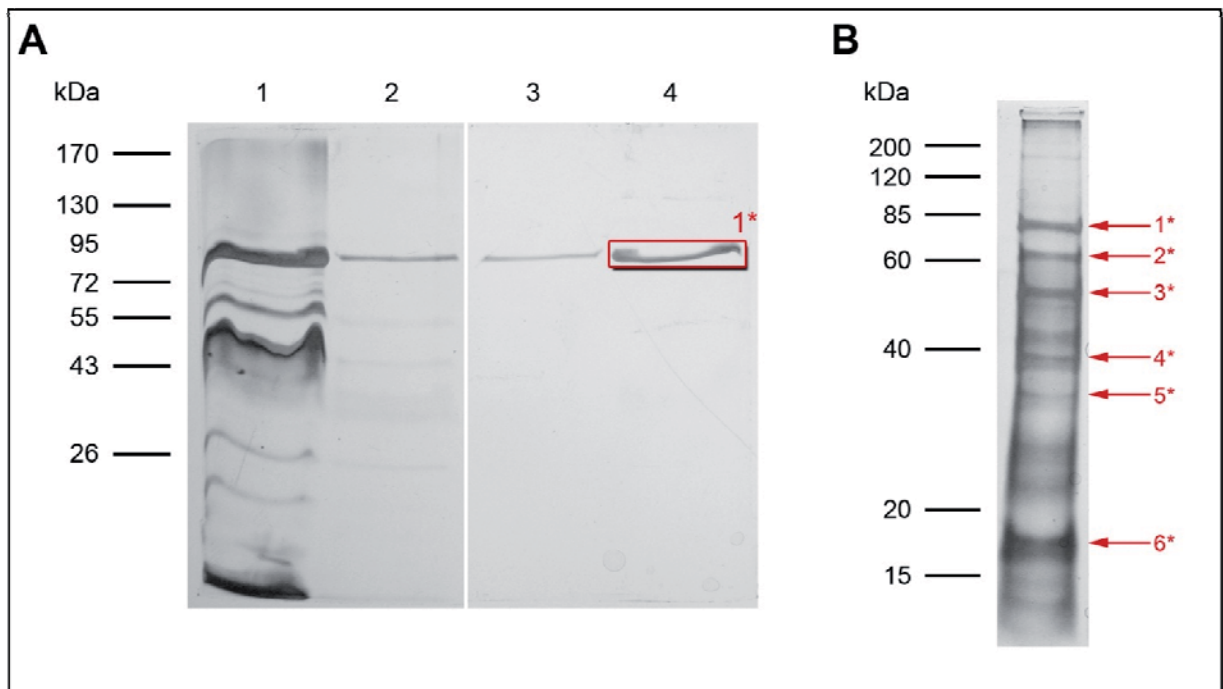
#### **2.1.1 Präparation der S-Layer Proteine**

Die Präparation des S-Layers von *Acidithiobacillus* wurde im Rahmen dieser Arbeit, verglichen mit Klingl (2007), weiter optimiert. Als ideales System stellte sich hierfür ein MES-Puffer mit pH 6.0 in Kombination mit den drei verschiedenen Detergenzien Triton-X100 (1 %), SDS (1 %) und Genapol X-080 (1.5 %) in der jeweils passenden Endkonzentration heraus. Die Extraktion der Lipide erfolgte dabei jeweils bei 60 °C (II.7.2). Insbesondere die milden Detergenzien Genapol X-080 und Triton-X100 erlaubten dabei eine klare Darstellung des negativ-kontrastierten 2D-Proteinkristalls (s.a. Klingl, 2007), welche eine anschließende Korrelationsmittelung gewährleistete (II.5.2.6). Eine derart gute Strukturhaltung spielte für eine elektrophoretische Auftrennung der Proteine eine untergeordnete Rolle. Die aufgetrennten Proteine konnten nun entweder vom SDS-Gel auf eine PVDF-Membran übertragen werden, um anschließend mittels Edman-Abbau (II.7.6.1) die N-terminale Sequenz zu bestimmen oder nach einem In-Gel-Verdau über MALDI MS/MS (II.7.6.2) zu identifizieren. Als Auffälligkeit sei an dieser Stelle noch anzumerken, dass bei einer Präparation des S-Layers des Stammes SP5/1 mit Pyrit als Substrat wesentlich mehr Proteine nach der Gelelektrophorese sichtbar waren als bei FeSO<sub>4</sub> (Abbildung 16 A). Neben der beschriebenen, konventionellen S-Layer-Präparation wurde zusätzlich versucht, das Proteingemisch durch eine anschließende CsCl-Dichtegradientenzentrifugation (Näther, 2007) weiter aufzureinigen, jedoch ohne nennenswerten Erfolg.

### 2.1.2 Identifikation ausgewählter Proteinbanden

Mit Hilfe der optimierten S-Layer-Präparation sollte einerseits der S-Layer des Isolates SP5/1 identifiziert und charakterisiert werden und andererseits ein Erfolg der Aufreinigung anhand des Nachweises weiterer Proteine aus der äußeren Membran aufgezeigt werden. Diese waren als Indiz dafür zu werten, dass sich das angewendete Protokoll für die Separierung von Proteinen aus der äußersten Zellwandschicht eignet.

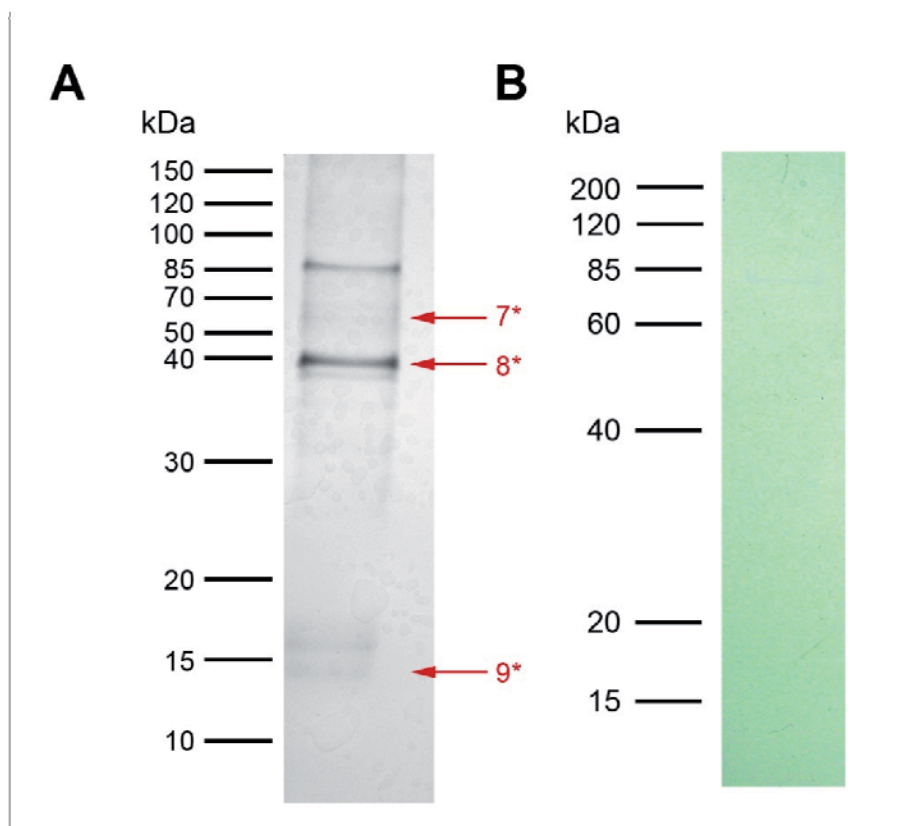
Für eine eingehende Analyse wurden sechs Proteinbanden ausgewählt. Hierzu zählten eine Bande mit etwa 85 kDa (1\*, Abbildung 16 A), welche einer N-terminalen Sequenzierung durch Edman-Abbau nach Elektrolot auf eine PVDF-Membran unterzogen wurde und fünf weitere prominente Proteinbanden, deren Identifikation durch MALDI MS/MS nach einem In-Gel-Verdau erfolgte. Die Wanderstrecke im SDS-Gel wies den ausgewählten Proteinen Massen von etwa 62 kDa, 55 kDa, 40 kDa, 35 kDa und 18 kDa zu (2\* - 6\*; Abbildung 16 B). Mit den so gewonnen Daten wurde Versucht, den einzelnen Proteinbanden codierende Sequenzen (Protein-ID) im Genom von *A. ferrooxidans* zuzuordnen.



**Abbildung 16:** Präparation des S-Layers des Stammes SP5/1 nach II.7.2. (A) SDS-PAGE (10 % AA) einer S-Layer-Präparation von SP5/1 gewachsen auf Pyrit (Spur 1 und 2) bzw. auf FeSO<sub>4</sub> (Spur 3 und 4). Die Detergenzextraktion erfolgte mit Triton-X100 (Spur 1 und 4) und mit SDS (Spur 2 und 3). Die rote Umrahmung und die Nummerierung (1\*) markieren den S-Layer (siehe auch Tabelle 3). Silberfärbung. (B) SDS-PAGE (10 % AA) zur Auftrennung und Identifikation ausgewählter Proteine (1\* - 6\*; siehe Tabelle 26).

S-Layer-Präparationen des Stammes HV2/2 mit Genapol (1.5 % in MES-Puffer, pH 6.0) zeigten bei einer Auftrennung der Proteine mittels SDS-PAGE ein zum Stamm SP5/1 vergleichbares Bandenmuster (Abbildung 17 A; vgl. Abbildung 16 A). Auch hier war eine dominante Bande bei 85 bis 90 kDa erkennbar, bei der es sich vermutlich um den S-Layer

handelt. Zusätzlich traten eine Bande bei 65 kDa, eine Doppelbande im Bereich von 40 kDa und zwei schwache Banden bei 14 und 16 kDa auf (7\* bis 9\*), welcher einer MS/MS-Analyse im Anschluss eines tryptischen Verdaus unterzogen werden konnten. Aufgrund der geringen Proteinkonzentration in S-Layer-Präparationen von HV2/2 war bisher weder eine Sequenzierung der S-Layer Bande noch ein Nachweis einer Glykosylierung der Proteine möglich, wie es für den Stamm SP5/1 der Fall war. In diesem Fall konnte mit Hilfe einer PAS-Färbung für das mutmaßliche S-Layer Protein bei ungefähr 85 kDa und für eine weiteres, schwach erkennbares Protein auf Höhe von etwa 35 kDa reduzierende Gruppen nachgewiesen werden, wodurch ein starker Hinweis auf eine Glykosylierung gegeben war (Abbildung 17 B).



**Abbildung 17:** Präparation des S-Layers des Isolates HV2/2 und Nachweis der Glykosylierung des S-Layers von SP5/1. Die Anzucht erfolgte unter Standardbedingungen auf Pyrit (II.2.2.1). (A) SDS-PAGE (10 % AA) der S-Layer Präparation des Isolates HV2/2, gewachsen auf Pyrit (II.4.2). Auftrennung und Identifikation ausgewählter Proteine (7\* - 9\*; sieheTabelle 26). (B) SDS-PAGE (10 % AA) mit anschließender PAS-Färbung zum Nachweis einer potentiellen Glykosylierung (II.7.4.4.3). Die Präparation erfolgte jeweils mit 1.5 % Genapol X-080 in MES-Puffer (pH 6.0).

## 2.1.3 Bioinformatische Analyse der Proteinsequenzen

Zusammen mit den Ergebnissen, generiert mit Hilfe des Vorhersageprogramms Phobius, der NCBI-Proteindatenbank sowie der Gewichtung bzw. Aussagekraft der erhaltenen Werte sind die Resultate der Sequenzanalysen in Tabelle 26 zusammengefasst. Sie werden im Folgenden, zusammen mit ergänzenden bioinformatischen Analysen und möglichen Strukturvorhersagen für jedes Protein separat erläutert.

Nr.	A	B	C	D	E
1*	„Slp90“	S-Layer; vermutlich Afe_2303 <i>1<sup>st</sup> hit:</i> -	(1) N'-AVTPAAN... (2)	SP/1*	M*
2*	Lferr_0698	Chaperonin GroEL <i>1<sup>st</sup> hit:</i> chaperonin GroEL (Afe_0542)	(1) 104 / 9 (2) 0.0 / 100	/	C
3*	Afe_0029	Tetrathionathydrolase <i>1<sup>st</sup> hit:</i> Pyrroloquinolin Quinon (Lferr_0030)	(1) 78 / 9 (2) 0.0 / 100	SP	OM
4*	Afe_2741	Major outer membrane protein 40 <i>1<sup>st</sup> hit:</i> Phosphate-selective porin O and P (Lferr_2362)	(1) 194 / 9 (2) 0.0 / 100	SP	M/P/E
5*	Lferr_0044	Putative sulfate-binding protein <i>1<sup>st</sup> hit:</i> putative sulfate binding protein (Lferr_0050)	(1) 251 / 56; 17 (2) 2e-141 / 99	SP	P
6*	Afe_3146	Rusticyanin <i>1<sup>st</sup> hit:</i> Rusticyanin (Lferr_2743)	(1) 342 / 8; 5 (2) 4e-84 / 100	SP	P
7*	Aca_2307	Heat shock protein 60 family chaperone GroEL <i>1<sup>st</sup> hit:</i> chaperonin GroEL (Lferr_0698)	(1) 132 / 13 (2) 0.0 / 91	/	C
8*	Aca_2352	Phosphate-selective porin O and P <i>1<sup>st</sup> hit:</i> Phosphate-selective porin O and P (Lferr_2362)	(1) 437 / 23 (2) 4e-87 / 48	/	M/P/E
9*	Aca_2766	Ribulose bisphosphate carboxylase small chain <i>1<sup>st</sup> hit:</i> Ribulose-bisphosphate carboxylase (Afer_0120)	(1) 357 / 12 (2) 3e-41 / 67	/	/

**Tabelle 26:** Übersicht der identifizierten Proteine (siehe auch Abbildung 16 A) nach N-terminaler Sequenzierung (1\*) bzw. MALDI MS/MS (2\* - 6\*). **A** Protein-ID; **B** Annotation und bester Treffer nach Abgleich mit der NCBI-Proteindatenbank; **C** Signifikanz der erhaltenen Treffer durch: (1) Gewichtung anhand des N-Terminus bzw. des Mascot-Scores der zugeordneten Peptide und Fragmente (*Score / Peptide*; Fragmente), (2) *e-value / Sequenzidentität* für den *1<sup>st</sup> hit* in % (# *e-value* schlechter als 0.01); **D** eventuell vorhandenes Signalpeptid und Anzahl der mit Phobius vorhergesagten Transmembran-Helices (TMH), \* gilt für Afe\_2303; **E** mit PSORTb vorhergesagte subzelluläre Lokalisation (C: cytoplasmatisch, M: membranständig, OM: äußere Membran, P: periplasmatisch, E: extrazellulär).

Rusticyanin

Bei dem mit 6\* gekennzeichneten 18 kDa Protein aus dem Stamm SP5/1 handelte es sich um Rusticyanin. Im unprozessierten Zustand besitzt das zur Familie der Kupfer-Oxidase (MMDB) zählende Protein eine Länge von 187 Aminosäuren, eine Molekularmasse von 19.85 kDa und einen theoretischen pI von 8.85 (ProtParam). Die Abspaltung eines 32

Aminosäuren langen Signalpeptids, identifiziert durch SignalP, führt zu einem Protein mit einem Molekulargewicht von 16.54 kDa und einer Länge von 155 Aminosäuren, welches Afe\_3146 aus *A. ferrooxidans* DSM 14882<sup>T</sup> zugewiesen werden konnte (Ronk *et al.*, 1991). Der Abgleich dieser Sequenz mit der NCBI Datenbank zeigte 100 % Sequenzidentität mit dem Protein Lferr\_2743 aus *A. ferrooxidans* (GenBank: AAB19892.1; *e-value*: 4e-84). Anhand einer Recherche in der Strukturdatenbank MMDB gelang es, die Röntgenkristallstruktur von Rusticyanin (Walter *et al.*, 1996) zu ermitteln und diese unter Zuhilfenahme von RasMol graphisch darzustellen (Abbildung 48 C, D).

Neben seiner Lokalisation im Periplasma spielt es eine entscheidende Rolle im Zusammenhang mit der Oxidation von Pyrit bzw. Fe<sup>2+</sup> (Valdés *et al.*, 2008). Die Intensität der Proteinbande im SDS-Gel spiegelt den hohen Bedarf an Rusticyanin für die Gewinnung von Energie aus der Fe<sup>2+</sup>-Oxidation wieder.

#### Sulfat-Bindeprotein

Eine Analyse des 35 kDa Proteins (5\*) identifizierte dieses als Lferr\_0044, ein Sulfat-Bindeprotein aus *A. ferrooxidans* (ATCC 53993; GenBank: ACH82306; 100 % Identität). Der Abgleich der kompletten Sequenz in der NCBI Datenbank gab Lferr\_0050, ebenfalls aus *A. ferrooxidans*, als besten Treffer an. Mit Hilfe des Programms SignalP konnte für das 336 Aminosäuren lange Protein ein Signalpeptid bestätigt werden, wobei Unklarheit bezüglich der möglichen Schnittstelle liegt. Wiederholte Auswertungen setzten diese entweder an Position 27 oder an Position 28. Unprozessiert zeichnet Lferr\_0044 laut MS/MS Recherche eine nominelle Masse von 36.65 kDa und einen berechneter pI von 9.10 aus. Für das im Periplasma lokalisierte Protein (PSORTb) ist außerdem vermerkt, dass es sich um ein sogenanntes periplasmatisches Substratbindeprotein (PBP) handelt. Hierzu zählen Membran-gebundene Komplexe und an Substrate gebundene, Membran-assoziierte periplasmatische Bindeproteine, die von bakteriellen periplasmatischen Transportsystemen dazu benutzt werden, eine Reihe von Substraten wie Aminosäuren, Peptide, Zucker oder Vitamine zu transportieren (NCBI). Die Region zwischen den Aminosäuren 73 und 332 zeigte Ähnlichkeiten zu den Substratbindedomänen von LysR-Typ Transkriptionsregulatoren (LTTRs).

#### „major outer membrane protein 40“

Mehrmalige Analysen tryptischer Peptidsequenzen aus dem enzymatischen Verdau der 40 kDa Bande (4\*) identifizierten diese als „major outer membrane protein 40“ (Omp40; Afe\_2741) aus *A. ferrooxidans* ATCC 19589 (Guiliani und Jerez, 2000; GenBank: CAA10107.1). Es handelt sich bei diesem Protein um ein Phosphat-selektives Porin (Pfam) der äußeren Membran, bestehend aus 404 Aminosäuren. Laut den Ergebnissen der MS/MS-

Analysen betrug die Masse des Monomeren Proteins 42.23 kDa und der pI 4.93. Der Vergleich von Omp40 mit der NCBI Datenbank ergab eine hundertprozentige Übereinstimmung mit dem Protein Lferr\_2362 (1<sup>st</sup> hit) aus *A. ferrooxidans* ATCC 53993. PSORTb gab für Omp40 an, dass es sich um ein Membran-ständiges periplasmatisches oder extrazelluläres Protein handelt. Tatsächlich repräsentiert es das Hauptprotein der äußeren Membran und tritt dort, wie vergleichbare Porine aus anderen Spezies, stets in Form von Trimeren auf, ersichtlich am Modell des ebenfalls Phosphat-selektiven Porins OprP aus *Pseudomonas aeruginosa* (Moraes *et al.*, 2007; Abbildung 48 A, B). SignalP gab für das ‚major outer membrane protein 40‘ ein 22 Aminosäuren langes Signalpeptid an. Bestätigt wurde dies durch die erfolgreiche Bestimmung des N-Terminus: ADTSNADTGPVVFYGAQ. Ein Blast dieser Sequenz führte zu Omp40 aus *A. ferrooxidans* ATCC 19589, Afe\_2741 aus *A. ferrooxidans* DSM 14882<sup>T</sup> bzw. Lferr\_2362 (40.01 kDa) aus *A. ferrooxidans* ATCC 53993 als beste Treffer eines kompletten Proteins (Score: 55.4; e-value: 9e-7; 100 % Sequenzabdeckung). Ebenso wie der Stamm SP5/1 besitzt auch das Isolat HV2/2 ein ‚major outer membrane protein 40‘ (8\*; Abbildung 17 A). MS/MS-Analysen ordneten die Peptidsequenzen dem Protein Aca\_2352 (ZP\_05292759.1) aus *A. caldus* DSM 8584<sup>T</sup> zu, welches aus 396 Aminosäuren aufgebaut ist und eine Masse von 41.95 kDa besitzt (pI 5.87). In Übereinstimmung mit Afe\_2741 lieferten Recherchen in der NCBI Datenbank Lferr\_2362 aus *A. ferrooxidans* ATCC 53993 als besten Treffer, abweichend konnte für Aca\_2352 jedoch kein Signalpeptid bestimmt werden.

#### Tetrathionat-Hydrolase

Als eine weitere dominante Bande auf Höhe von 55 kDa im SDS-Gel wurde das Protein mit der Indexierung 3\* einem tryptischen Verdau unterzogen, die erhaltenen Peptide sequenziert und mit den Datenbanken abgeglichen. Das Protein wurde als Tetrathionat-Hydrolase Afe\_0029 identifiziert. Die entsprechende, bei GenBank hinterlegte Sequenz (BAF03501) stammt aus *A. ferrooxidans* DSM 14882<sup>T</sup> und ist aus 499 Aminosäuren aufgebaut. Neben einem N-terminalen Signalpeptid (Länge: 32 Aminosäuren) erfolgte die zelluläre Lokalisation mittels PSORTb eindeutig in der äußeren Membran. Hier katalysiert das Enzym vermutlich die Umsetzung von Tetrathionat zu Thiosulfat (Kanao *et al.*, 2007; Valdés *et al.*, 2008). Auffälligkeiten innerhalb der Aminosäuresequenz waren zwei sogenannte PQQ-DH-Regionen zwischen den Resten 139 und 168 sowie zwischen 215 und 379 und ein *WD40-like repeat* unbekannter Funktion von Aminosäure 368 bis 483. Unter der Bezeichnung PQQ-DH-Region sind Bereiche zu verstehen, wie sie typisch sind für Dehydrogenasen mit Pyrroloquinolin Quinon (PQQ) als Cofaktor. Vergleichbare Regionen finden sich auch in Ethanol-, Methanol- und Membran-gebundenen Glukose-Dehydrogenasen. Ein Abgleich der oben

genannten Sequenz von Afe\_0029 bei NCBI ergab als besten Treffer das Pyrroloquinolin Quinon Lferr\_0030 mit einer Übereinstimmung von 100 %.

#### Chaperonin GroEL

Ungewöhnlich erschien die Identität des Proteins mit der Nummer 2\*, bei dem es sich um Lferr\_0698, dem Chaperonin GroEL von *A. ferrooxidans* ATCC 53993, handelt (Pfam: chaperonin Cpn60/TCP-1). Die höchste Sequenzähnlichkeit bestand zum Chaperonin GroEL Afe\_0542 aus *A. ferrooxidans* DSM 14882<sup>T</sup>. Als ausgewiesenes, cytoplasmatisches Protein ist es bei der S-Layer-Präparation vermutlich als Verunreinigung zu betrachten. Die hohe Affinität, an andere Proteine zu binden verleiht GroEL eine gewisse „stickiness“ (Peter A. Lund, School of Bioscience, University of Birmingham; pers. Mitteilung) und ist so im Allgemeinen auch in hohem Maße in Fraktionen der äußeren Membran und des Periplasmas zu detektieren.

Das monomere Protein Lferr\_0698 war aus 551 Aminosäuren aufgebaut und besaß, typisch für das Cytoplasma, kein Signalpeptid. Anhand der MS/MS-Analysen ergeben sich eine nominelle Masse von 58.59 kDa und ein pI-Wert von 5.20. Üblicherweise formen die Monomere von GroEL einen Doppeltorus, welcher aus zwei aufeinandergestapelten Ringen gebildet wird, die ihrerseits aus sieben bis neun Monomeren besteht. Aus diesem Grund finden sich in der Sequenz von Lferr\_0698 Oligomerisierungs-Sites und die Möglichkeit zur Stapelbildung. Außerdem gibt es Bindestellen für ATP und Magnesium. GroEL katalysiert als Oligomer die Rückfaltung falsch gefalteter Polypeptide. Homologe Versionen des Chaperonins Lferr\_0698 aus *A. ferrooxidans* ATCC 53993 finden sich neben *A. ferrooxidans* DSM 14882<sup>T</sup> auch in *A. caldus* DSM8584<sup>T</sup>. Als eben dieses Protein Aca\_2307 (ZP\_05292759) aus *A. caldus* wurde die Proteinbande 7\* (Abbildung 17 A) aus einer S-Layer Präparation des Stammes HV2/2 identifiziert. Das aus 549 Aminosäuren bestehende Protein mit einer Masse von 58.31 kDa und einem theoretischen pI von 5.41 besitzt ebenso wie Lferr\_0698 kein Signalpeptid und ist laut PSORTb im Cytoplasma lokalisiert. Ein Abgleich mit der NCBI Datenbank führte zu dem Chaperonin GroEL aus *A. ferrooxidans* ATCC 53993.

#### Ribulose-Bisphosphat-Carboxylase

Die Analyse der Peptidsequenzen, welche aus der 14 kDa Bande gewonnen wurden (Bande 9\*; Abbildung 17 A), identifizierten das Protein als Ribulose-Bisphosphat-Carboxylase aus *A. caldus* DSM 8584<sup>T</sup> (Aca\_2766; ZP\_05293092.1). Eine NCBI Datenbankanalyse des 110 Aminosäuren langen Proteins mit einer Masse von 13.19 kDa (theoretischer pI: 6.09) ergaben als besten Treffer Afer\_0120, eine Ribulose-Bisphosphat-Carboxylase aus *Acidimicrobium ferrooxidans* DSM 10331. Die Identität der 16 kDa Bande aus der S-Layer Präparation des Stammes HV2/2 (Abbildung 17 A) konnte bislang nicht geklärt werden.

### S-Layer Protein

Aufgrund der relativ niedrigen Proteinkonzentration, welche in der Bande mit der Nummer 1\* stets vorlag, konnte ihre Identität nicht mit Hilfe eines tryptischen In-Gel Verdau mit anschließender MS/MS-Analyse aufgeklärt werden. Deshalb wurden die Proteine im Anschluss an eine SDS-PAGE auf eine PVDF-Membran übertragen und der N-Terminus mittels Edman-Abbau (s.a. Abschnitt II.7.6.1) mit folgendem Ergebnis bestimmt: AVTPAANGTLPGAFSTNQ. Lediglich bei Position 5 herrschte eine gewisse Unsicherheit und bei dem identifizierten Alanin könnte es sich unter Umständen auch um Prolin handeln.

Ein NCBI Blast der N-terminalen Proteinsequenz lieferte keine signifikanten Ergebnisse (s.a. Abschnitt VII.2, Slp90). Da keine eindeutige Identifizierung des Proteins möglich war, wurde es im Hinblick auf sein Laufverhalten im Gel und im Bezug auf frühere Hinweise zu einem 92 kDa Protein unbekannter Funktion (Mjoli und Kulpa, 1988) als Slp90 (S-Layer Protein, 90 kDa) bezeichnet. Durch eine Recherche in der NCBI Datenbank konnte im Genom von *A. caldus* ein hypothetisches S-Layer Protein Slp (GenBank: ACI62952.1) gefunden werden. Ein Proteinblast mit der Aminosäuresequenz dieses Proteins resultierte in homologen Proteinen in Vertretern der Spezies *A. ferrooxidans* und *A. thiooxidans*. Diese sind zusammen mit der entsprechenden GenBank-Identifikationsnummer, der Zahl der Aminosäuren (AS) und ihrer möglichen Rolle im entsprechenden Organismus in Tabelle 27 zusammengefasst. In Anbetracht der phylogenetisch engen Verwandtschaft von *A. ferrooxidans* DSM 14882<sup>T</sup> zum Eigenisolat SP5/1, wurde versucht, einen möglichen Zusammenhang zwischen Afe\_2303 und der N-terminalen Sequenz des Proteins Slp90 herzustellen. Mit dem NCBI Tool COBALT (*Constraint-based Multiple Alignment Tool*) gelang es, ein Alignment zwischen der partiellen Sequenz von Slp90, den Aminosäuren 390 bis 407 in Afe\_2303 und den Aminosäuren 382 bis 399 in Slp aus *A. caldus* zu generieren.

Organismus	GenBank	Funktion	AS
<i>A. caldus</i> DSM 8584 <sup>T</sup>	ACI62952.1	hypothetical surface layer protein Slp	948
<i>A. ferrooxidans</i> DSM 14882 <sup>T</sup>	ACK78260.1	hypothetical protein Afe_2303	945
<i>A. ferrooxidans</i> ATCC 53993	ACH84165.1	lipoprotein, putative; Lferr_1946	945
<i>A. thiooxidans</i> ATCC 19377	ACI62907.1	putative surface layer protein SLP	371

**Tabelle 27:** NCBI Datenbankrecherche bezüglich potentieller S-Layer Proteine in *Acidithiobacillus*.

Für 5 der 18 N-terminalen Aminosäuren in Slp90 wurde eine Übereinstimmung festgestellt, was an diesem Punkt nur einen Hinweis darstellte. Deshalb wurde aus dem MUSCLE-Alignment von Slp aus *A. caldus* (DSM 8584<sup>T</sup>) und Afe\_2303 aus *A. ferrooxidans* (DSM 14882<sup>T</sup>) die Konsensussequenz erstellt und versucht, diese dem N-terminalen Bereich von

Slp90 gegenüberzustellen (|, Übereinstimmung; -, *Spacer*; +, homologe Aminosäuresubstitution).

```
Slp90          AVTPAANGTLPGAFSTNQ
                |+ | + | || |+| |
Afe_2303      GAM-PHSLGLLPTAWSP-QDLVPA
Consensus     P SL LLPTAWSP-QDL +
Slp-A.caldus  RDR-PESLALLPTAWSP-QDLAVS
```

Mit Hilfe dieses Alignments war es zumindest möglich, eine Übereinstimmung von acht Aminosäuren zu erreichen, während an drei weiteren Positionen eine Substitution durch eine jeweils homologe Aminosäure stattfand. Darüber hinaus ergab sich mit COBALT eine bedingte Übereinstimmung zum N-Terminus des S-Layer Proteins aus *B. stearothermophilus*, einem Gram-positiven Bakterium, dessen S-Layer sich ebenfalls durch p2-Symmetrie auszeichnet. Gleiches galt für Sequenzabschnitte des ORF 13 aus einem *A. caldus* Eigenisolat und ORF contig01016 aus einem *Acidithiobacillus* Stamm G8, die jeweils vom Lehrstuhl Mikrobiologie von Prof. Dr. Mike Jetten (Department of Microbiology, Institute for Water and Wetland Research, Radboud Universität Nijmegen, Niederlande) stammten (s.a. VII.2). Beide Leseraster codierten laut NCBI ein Porin der äußeren Membran in *A. caldus*, wobei die Gene auf einem Plasmid lokalisiert sind. Die NCBI-Blasts wie auch die Sequenzen der ORFs und aller beschriebenen S-Layer finden sich zusätzlich im Anhang (s.a. VII.2).

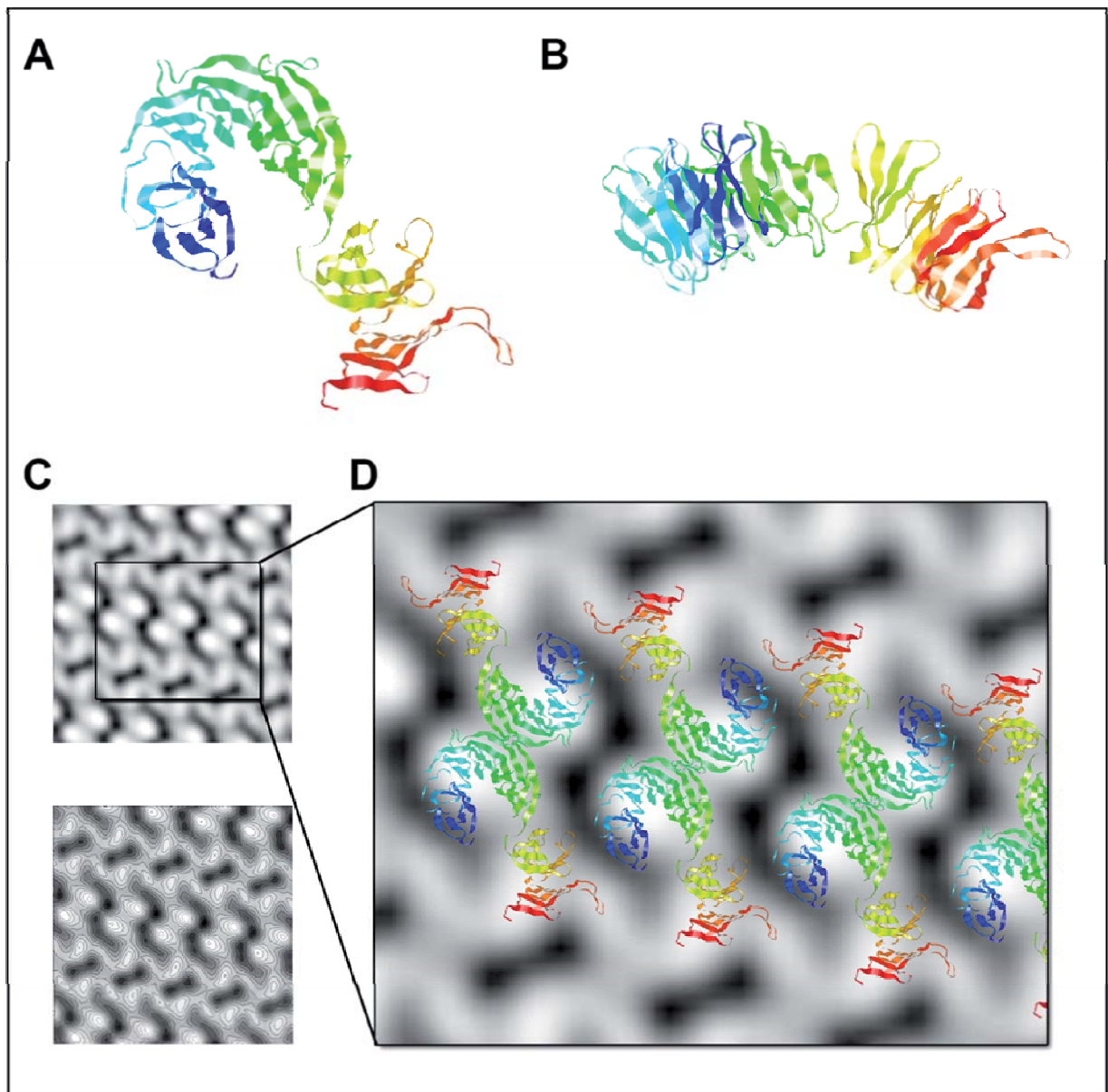
Da für das S-Layer Protein Slp90 des Isolates SP5/1 keine weiteren Daten verfügbar waren, beschränken sich alle weiteren Erkenntnisse auf Resultate bezüglich der Untersuchungen an den Proteinen Afe\_2303 aus *A. ferrooxidans* DSM 14882<sup>T</sup> und Slp aus *A. caldus* DSM 8584<sup>T</sup>.

#### 2.1.4 Das potentielle S-Layer Protein Afe\_2303

Die berechnete Molekularmasse des potentielle S-Layer Proteins Afe\_2303 aus *A. ferrooxidans* DSM 14882<sup>T</sup> betrug 103.69 kDa (theoretischer pI: 6.46), die von Slp 103.41 kDa (theoretischer pI: 6.37). Im Fall des Proteins Afe\_2303 waren 99 Aminosäuren negativ geladen (Aspartat (7.1 %) und Glutamat 3.4 %) und 91 positiv (Arginin (7.5 %) und Lysin (2.1 %)); die häufigsten Aminosäuren waren Leucin (10.2 %) und Alanin (9.6 %). Vergleichbare Aminosäureverhältnisse zeigte auch das Slp Protein aus *A. caldus*. Übereinstimmend wurde beiden Proteinen mittels der Programme SOSUI, SignalP und ProtParam ein Signalpeptid mit einer Schnittstelle zwischen Aminosäure 22 und 23 sowie eine darin enthaltene

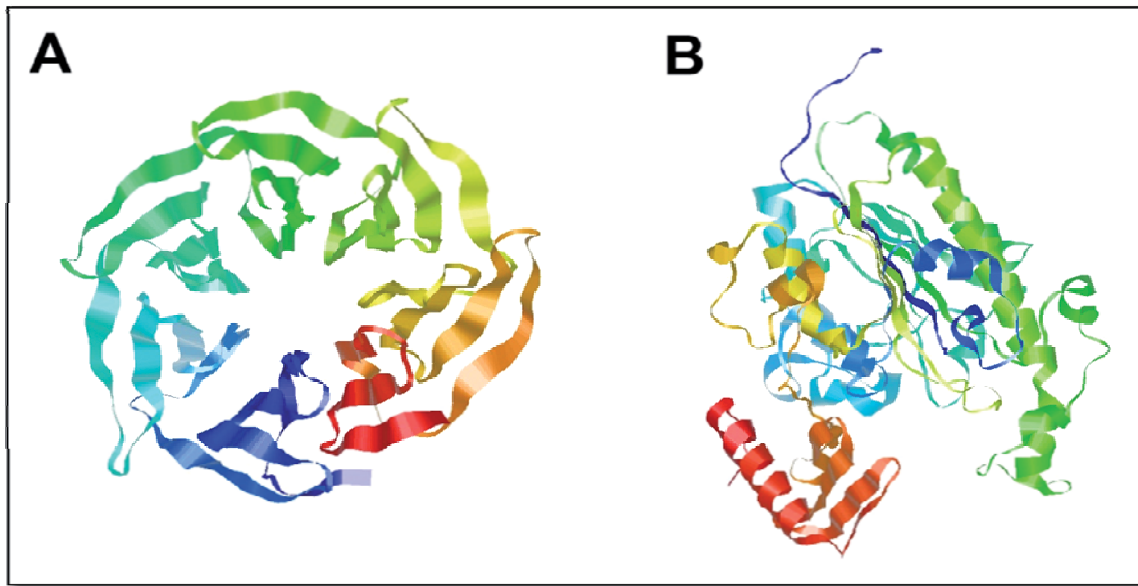
Transmembranhelix (TMHMM) bescheinigt. Weitere Besonderheiten waren eine Coiled-coil-Region (AS 304-332; SOSUI<sub>Coil</sub>), ein Abschnitt, welcher als WD40/YVTN\_repeat-like ausgewiesen wird, ein signifikanter Pfam-A Treffer bezüglich der Aminosäuren 204 bis 425, welche eine Verbindung zu 3-Carboxy-cis,cis-Muconat-Lactonisierender Enzyme herstellte, sowie zwei insignifikante Pfam-A Übereinstimmungen der Aminosäuren 504 bis 620 und 680 bis 845 zur Familie der Phosphoesterasen. Eine Vorhersage bezüglich der zellulären Lokalisation des vermutlich löslichen Proteins Afe\_2303 (SOSUI<sub>pcp28/pbpcc</sub>) führte zu unterschiedlichen Ergebnissen. Es wurden unter anderem die Cytoplasmamembran (PSORTb) und das Periplasma (SOSUI<sub>GramN</sub>) angegeben. Die Resultate der Analysen mit den Programmen Phobius und TMHMM deuten, mit Ausnahme des Signalpeptids, eine Lokalisation außerhalb der Cytoplasmamembran an.

Um einen Eindruck der dreidimensionalen Struktur von Afe\_2303 zu bekommen, wurde versucht, auf dem PHYRE Server Modelle des gesamten Proteins (Abbildung 18), des N-terminalen Bereichs bis Aminosäure 389 und des C-terminalen Abschnitts ab Aminosäure 390 zu erstellen (Abbildung 19). Der Vergleich des Modells von Afe\_2303 und des N-terminalen Abschnitts zeigte, dass die ringförmige Struktur aus dem N-Terminus gebildet wird (vgl. Abbildung 18 A und Abbildung 19 A). Hierbei handelte es sich um einen sogenannten *7-bladed beta-propeller* (Strukturfamilie: *WD40 repeat-like*; PHYRE Server), das berechnete Molekulargewicht für den N-terminalen Abschnitt beträgt 41.75 kDa (pI 8.71). Diesbezüglich zeigte der C-terminale Abschnitt, welcher als Homolog des Proteins Slp90 betrachtet wurde, eine berechnete molekulare Masse von 61.95 kDa und einen theoretischen pI von 6.06. In anbetracht der starken Glykosylierung des S-Layers war eine apparente Masse im SDS-Gel im Bereich von 85 bis 90 kDa durchaus anzunehmen. Zudem wäre eine proteolytische Spaltung von Afe\_2303 in das 62 und 42 kDa-Protein eine hinreichende Erklärung für das Auftreten mehrere Banden in den Western-Blot-Analysen (s.a. III.2.4) und für die Doppelbande im Bereich von 40 kDa im Rahmen von S-Layer Präparationen des Stammes SP5/1 (Abbildung 16 B).



**Abbildung 18:** Vergleich des Modells von Afe\_2303 mit einer Korrelationsmittelung des S-Layers des Isolates SP5/1. Modell des Proteins Afe\_2303 (c1nroA) in der Aufsicht (A) bzw. Seitenansicht (B). Erstellt mit Hilfe des PHYRE Servers. Laut PDB handelt es sich dabei um ein Strukturprotein. Als Vorlage diente das *Caenorhabditis elegans* Homolog des *Actin interacting proteins 1* aus Hefe. (C) Korrelationsmittelung (oben) zusammen mit Höhenlinien der Struktur (unten) des S-Layers von SP5/1. (D) Vergrößerter Ausschnitt aus (C), überlagert mit mehreren Kopien des Modells aus (A).

Zusätzlich wurde anhand einer Korrelationsmittelung des isolierten S-Layer Proteins aus dem Stamm SP5/1 die Übereinstimmung der kontrastarmen Bereiche (hell) mit der Struktur des Lambda-förmigen Modells von Afe\_2303 aufgezeigt (Abbildung 18 D). Der N-terminale *7-bladed beta-propeller* deckt sich dabei erstaunlich gut mit den Bereichen der höchsten Proteinkonzentration des negativ-kontrastierten S-Layers (weiß).



**Abbildung 19:** Modelle des partiellen Proteins Afe\_2303, generiert mit Hilfe des PHYRE-Servers. (A) Modell des N-terminalen Bereichs des Proteins bis Aminosäure 389 (D1TBGA). 7-bladed beta propeller (fold) auf Basis eines WD40 repeat like (e-value: 4.8e-28). (B) Modell des C-terminalen Abschnitts des Proteins ab Aminosäure 390 (c2qzuA). Hydrolase (fold) auf Basis einer potentiellen Sulfatase Yidj aus *Bacteroides fragilis* (e-value: 8.3e-19).

Neben der Analyse der Proteinsequenzen und verschiedener Strukturvorhersagen wurde versucht, die Gene *slp* und *afe\_2303*, welchen den S-Layern in *A. caldus* DSM 8584<sup>T</sup> und *A. ferrooxidans* DSM 14882<sup>T</sup> zugrundeliegen, mittels PCR in den Stämmen HV2/2 und SP5/1 nachzuweisen (II.9.5). Allerdings waren die bislang getesteten Variationen während der Amplifikation bezüglich eingesetzter DNA und Annealingtemperatur ohne Erfolg.

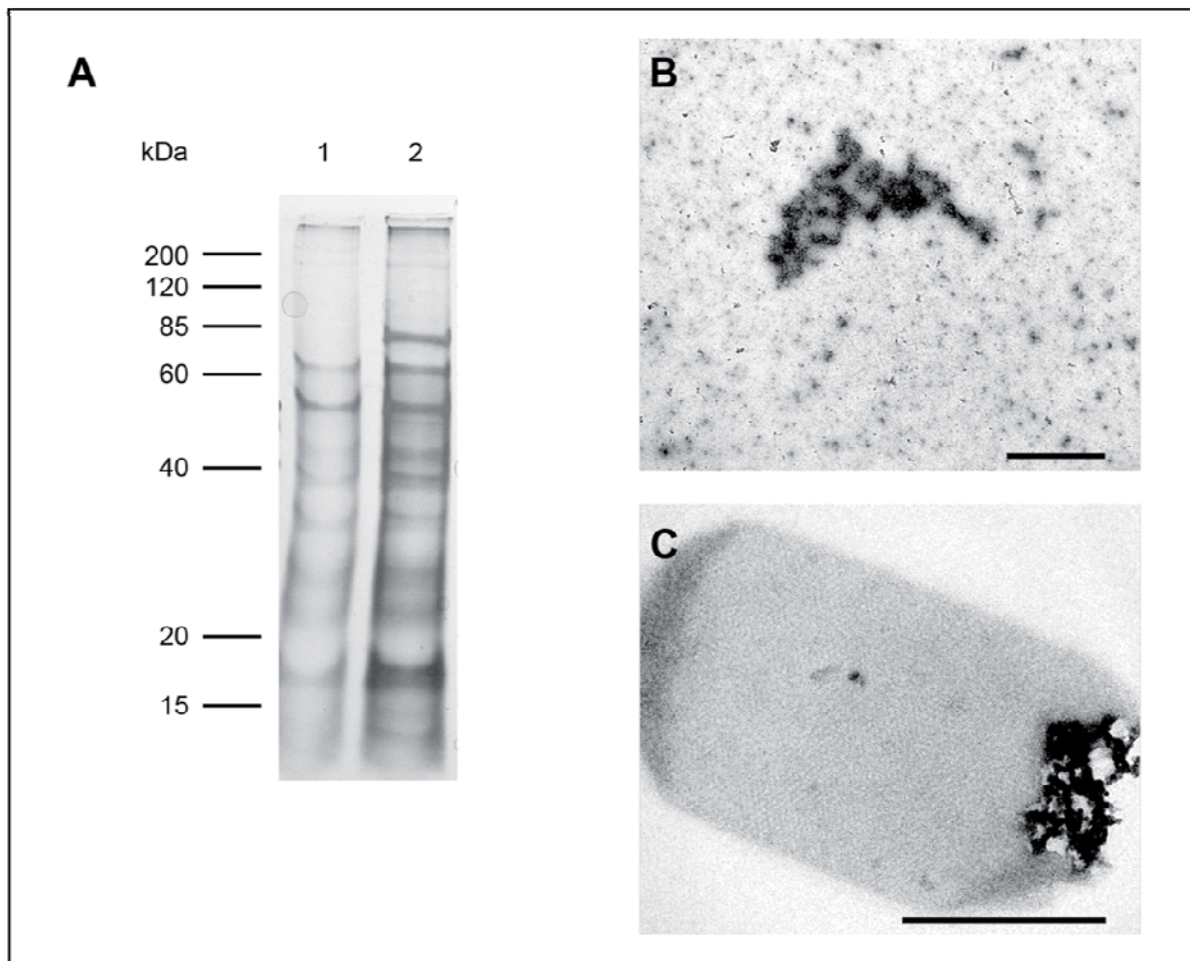
## 2.2 Untersuchung der Funktionalität des S-Layers mit Hilfe des Laborstammes $\Delta$ Slp90

Um Fragen hinsichtlich einer möglichen Funktionalität des S-Layer Proteins Slp90 beantworten zu können, wurden vergleichende Studien zwischen dem Wildtypstamm SP5/1 und der Labormutante  $\Delta$ Slp90 angestellt. Zunächst sollte hierzu geklärt werden, ob ein Fehlen des Oberflächenproteins einen physiologischen Nachteil, insbesondere im Bezug auf eine Oxidation von Pyrit, nach sich zieht. Ein direkter Gradmesser für die Umsatzrate von Pyrit war die Bestimmung des gelösten Fe<sup>2+</sup> über einen längeren Zeitraum hinweg (s.a. Gleichung [1], Abschnitt I.2). Des Weiteren sollte für das Protein Slp90 eine Beteiligung an der Komplexierung von Fe<sup>3+</sup> und dem damit verbundenen Zusammenhang zu EPS (Sand und Gehrke, 2006) erörtert werden. Außerdem gab es Hinweise in früheren Arbeiten, dass es in Kulturen des, üblicherweise stäbchenförmigen, Isolates SP5/1 zu annähernd kokkoiden Zellformen kommen kann (Huber, 1987). Aufgrund dessen stand auch eine mögliche, Zellform-bestimmende bzw. -erhaltende Funktion des S-Layers sowie Unterschiede im Aufbau der Zellwand im Fokus elektronenmikroskopischer Untersuchungen. Zusätzlich

wurde bei jeder Probennahme die Zellzahl lichtmikroskopisch bestimmt (II.5.1.2); eine Unterscheidung zwischen planktonischen und sessilen Zellen konnte durch eine Färbung der Zellen mit DAPI (II.5.1.3) erreicht werden.

### 2.2.1 Identifikation des S-Layer defizienten Laborstammes $\Delta$ Slp90

Im Laufe der Untersuchungen am S-Layer des Isolates SP5/1 kam es zu Schwierigkeiten hinsichtlich einer Aufreinigung des Proteins. Weder in negativ-kontrastierten Suspensionspräparaten noch im Rahmen einer Gelelektrophorese konnte das mutmaßliche Protein nachgewiesen werden. Da an diesem Punkt die Möglichkeit in Betracht gezogen wurde, dass es sich bei dem untersuchten Stamm um einen „Laborkrüppel“ handeln könnte, welcher durch wiederholte Überimpfung vom Wildtyp abweichende Eigenschaften entwickelte, wurde der Stamm SP5/1 aus der Bakteriensammlung des Lehrstuhls Mikrobiologie (Universität Regensburg) erneut angezogen. Anschließend wurden die Experimente parallel zu dem, aufgrund des fehlenden S-layer Proteins,  $\Delta$ Slp90 genannten Laborstammes durchgeführt. Hierbei zeigte sich nach einer S-Layer-Präparation mit 1.5 % Genapol in MES-Puffer (pH 6.0), dass bei sowohl bei SP5/1 als auch bei  $\Delta$ Slp90 Proteine im SDS-Gel nachweisbar waren, welche für die Lebensfähigkeit der Organismen essentiell sind. Hierzu zählen unter anderem das bereits unter III.2.2 beschriebene Chaperonin GroEL oder das *major outer membrane protein 40'*. Jedoch trat bei dem frisch angezüchteten Wildtypstamm bei etwa 85 kDa eine zusätzliche prominente Bande auf, welche in der Präparation des Laborstammes nicht nachzuweisen war (Abbildung 20 A). Für dieses Protein, welches den mutmaßlichen S-Layer darstellt, konnte in diesem Zusammenhang nun auch die N-terminale Sequenz bestimmt werden. Weitere Hinweise hinsichtlich der eindeutigen Identität der 85 kDa-Bande lieferten Suspensionspräparate der S-Layer-Präparationen. Im Gegensatz zu den unstrukturierten Proteinaggregaten, wie sie bei  $\Delta$ Slp90 vorlagen (Abbildung 20 B), konnten geordnete 2D-Kristalle der S-Layer-Untereinheiten nur in Proben des Wildtypstammes SP5/1 nachgewiesen werden (Abbildung 20 C).



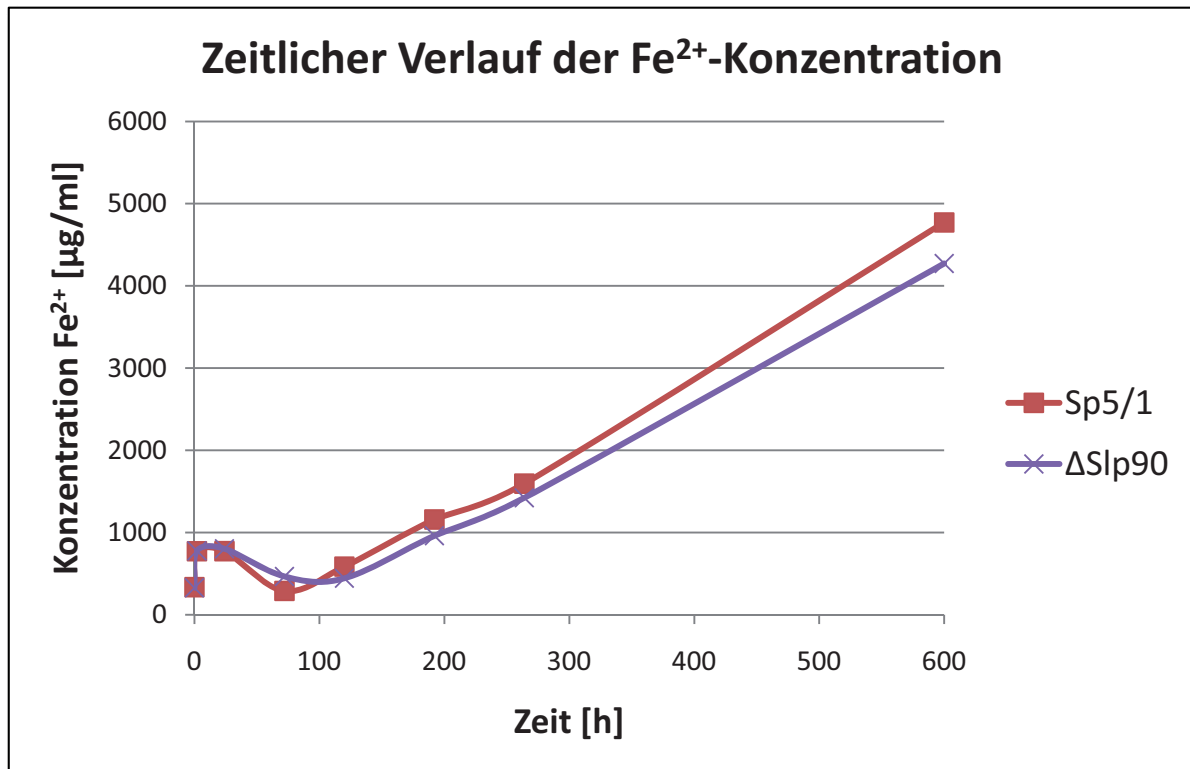
**Abbildung 20:** Präparation des S-Layers der Stämme SP5/1 und  $\Delta$ Slp90. Die Anzucht erfolgte unter Standardbedingungen auf Pyrit (II.2.2.1). (A) SDS-PAGE (10 % AA) zur Auftrennung der Proteine in der S-Layer-Präparation von  $\Delta$ Slp90 (Spur 1) und SP5/1 (Spur 2) mit 1.5 % Genapol X-080 in MES-Puffer (pH 6.0). Silberfärbung. Negativkontrastierte Suspensionspräparate dieser S-Layer-Extraktionen zeigten ein ungeordnetes Proteingemisch (B). Lediglich bei SP5/1 wurden strukturierte S-Layer gefunden (C). Balken: je 500 nm.

### 2.2.2 Ermittlung der physiologischen Aktivität

Anhand einer kontinuierlichen und zeitabhängigen Aufzeichnung der Konzentration an  $\text{Fe}^{2+}$ -Ionen ließ sich die physiologische Aktivität der Stämme SP5/1 und  $\Delta$ Slp90 vergleichend darstellen. Das in Lösung gehende  $\text{Fe}^{2+}$  stand hierbei in direktem Zusammenhang zur Oxidation von  $\text{FeS}_2$  (Gleichung [1], Abschnitt I.2). Die Konzentration wurde dabei mit dem Ferrozin-Assay nach Lovley und Phillips (1986; s. a. II.6.3) photometrisch bestimmt. Für eine quantitative Bewertung der  $\text{Fe}^{2+}$ -Konzentration war die Zelldichte ein entscheidendes Kriterium. Da sich im Verlauf der gesamten Inkubationsperiode kein signifikanter Unterschied hinsichtlich der Entwicklung der Zellzahlen (etwa  $5 \times 10^8$  Zellen/ml) zeigte, konnte dieser Faktor jedoch vernachlässigt werden.

Sowohl in den Kulturen des Isolats SP5/1 wie auch des Laborstammes  $\Delta$ Slp90 war nach einem leichten Rückgang der  $\text{Fe}^{2+}$ -Konzentration zu Beginn des Experiments nach etwa 100 Stunden ein steter und gleichmäßiger Anstieg zu erkennen. Bezüglich der rückläufigen  $\text{Fe}^{2+}$ -

Konzentration konnte eine anfängliche Oxidation von gelöstem  $\text{Fe}^{2+}$  zu  $\text{Fe}^{3+}$  nur vermutet werden. Ebenso verhielt es sich mit der Annahme, dass das produzierte  $\text{Fe}^{3+}$  nach 100 h zu einer steigenden Oxidation des Pyrits beitrug, wodurch vermehrt  $\text{Fe}^{2+}$  in Lösung ging. Somit würde die Menge an neu gebildetem  $\text{Fe}^{2+}$  den Betrag der Rückoxidation zu  $\text{Fe}^{3+}$  übersteigen. Die bei der abiotischen Pyrit-Oxidation verbrauchten  $\text{Fe}^{3+}$  Ionen würden dabei wiederum durch die Organismen aus  $\text{Fe}^{2+}$  regeneriert und stünden für eine erneute Reaktion zur Verfügung. Bezüglich der Konzentration an gelöstem  $\text{Fe}^{2+}$  wurde deutlich, dass diese beim Stamm  $\Delta\text{Slp90}$  mit 4.3 mg/ml nach 600 h nur unwesentlich geringer ausfiel, als beim Wildtyp SP5/1, für den 4.7 mg/ml gemessen werden konnten (Abbildung 21). Damit konnte in diesem Zusammenhang die Aussage getroffen werden, dass der S-Layer keinen entscheidenden Einfluss auf die physiologische Aktivität im Sinne der Oxidation von Pyrit hatte.

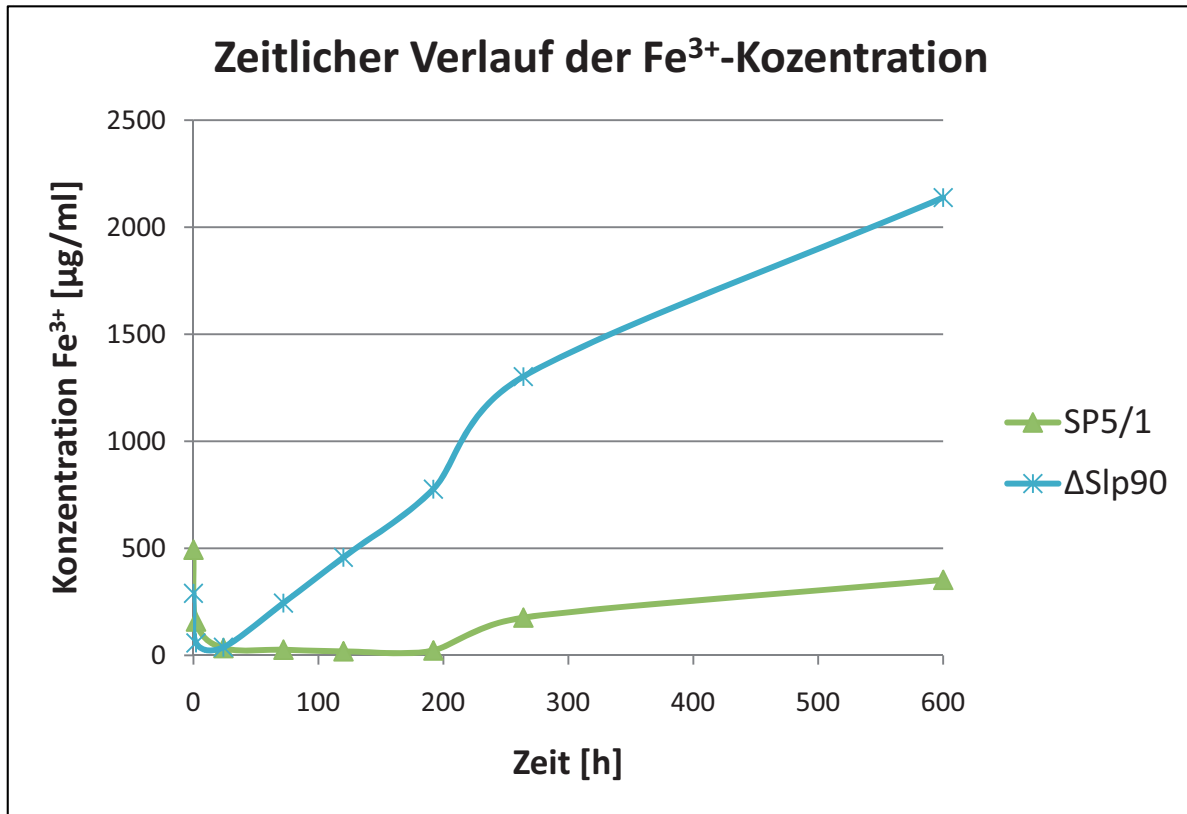


**Abbildung 21:** Zeitanhängiger Verlauf der  $\text{Fe}^{2+}$ -Konzentration über die Zeit beim Wachstum der Stämme SP5/1 und  $\Delta\text{Slp90}$ . Die Bestimmung der  $\text{Fe}^{2+}$ -Konzentration erfolgte mit Hilfe des Ferrozin-Assay nach Lovley und Phillips (1986; siehe auch II.6.3).

### 2.2.3 Komplexierung von $\text{Fe}^{3+}$ -Ionen und Verlauf des pH-Wertes

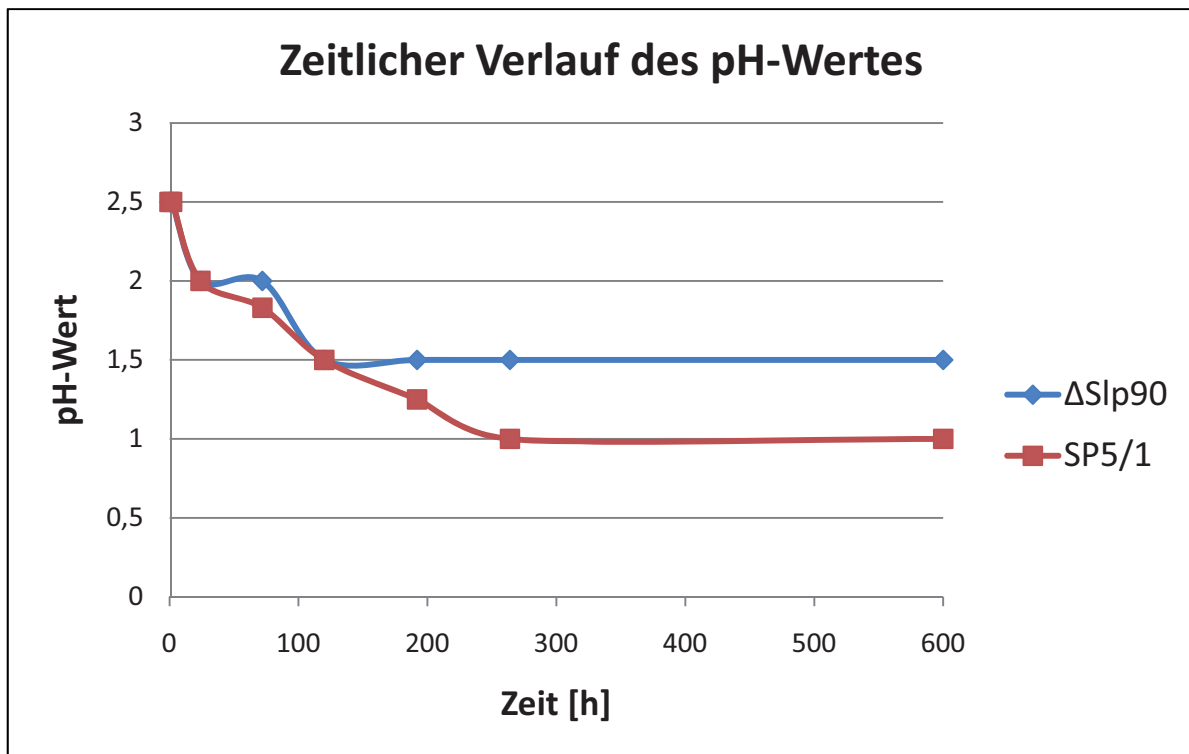
Im Vergleich zu dem relativ einheitlichen zeitlichen Verlauf der  $\text{Fe}^{2+}$ -Konzentration, zeigten sich bei der Bestimmung von  $\text{Fe}^{3+}$  deutliche Unterschiede zwischen den Stämmen SP5/1 und  $\Delta\text{Slp90}$ . Beim Wildtyp war ein relativ geringer Anstieg an  $\text{Fe}^{3+}$ -Ionen zu beobachten. Nach 600 h betrug die Konzentration 0.35 mg/ml (Abbildung 22). Im Gegensatz dazu war für

den Laborstamm  $\Delta$ Slp90 ein deutlicher Anstieg zu verzeichnen und die Konzentration war nach 600 h mit einem Wert von 2.1 mg/ml im Vergleich zu SP5/1 um das 6-fache erhöht.



**Abbildung 22:** Zeitabhängiger Verlauf der Fe<sup>3+</sup>-Konzentration über die Zeit beim Wachstum der Stämme SP5/1 und  $\Delta$ Slp90 auf Pyrit. Die Bestimmung der Fe<sup>3+</sup>-Konzentration erfolgte mit Hilfe des Ferrozin-Assay nach Lovley und Phillips (1986; siehe auch II.6.3).

Mit der Oxidation von Pyrit einhergehend war in sämtlichen Experimenten ein Absinken des pH-Wertes durch die Freisetzung von Schwefelsäure zu beobachten (s.a. Gleichung [1] und [3], Abschnitt I.2) zu beobachten. Hierbei war innerhalb der ersten 120 h für die Stämme SP5/1 und  $\Delta$ Slp90 kein signifikanter Unterschied im Rückgang des pH-Wertes von 2.5 auf 1.5 zu erkennen (Abbildung 23), jedoch zeigte sich im weiteren Verlauf des Experiments, dass der pH-Wert im Medium von SP5/1 bis auf 1.0 sank, während er beim Laborstamm  $\Delta$ Slp90 bei 1.5 konstant blieb. Einhergehend mit dieser Beobachtung traten nach 192 h im Kulturmedium von  $\Delta$ Slp90 gelblich-orange Präzipitate auf. Diese konnten in konzentrierter Salzsäure aufgelöst werden, weshalb es sich dabei vermutlich um Jarosit, einem Fe(III)-Komplex handelte. Eine weitere Auffälligkeit war die Korrelation der ersten Beobachtungen dieser Präzipitate bei  $\Delta$ Slp90 mit dem Anstieg der Konzentration an Fe<sup>3+</sup>-Ionen über den Wert von 0.5 mg/ml. Ein derart hoher Wert wurde im Falle von SP5/1 auch nach 600 h nicht erreicht. Da bei diesem Stamm auch keine Präzipitate beobachtet werden konnten, ist eine Grenze bezüglich ihrer Bildung ab einer Fe<sup>3+</sup>-Konzentration im Bereich von 0.5 mg/ml anzunehmen.

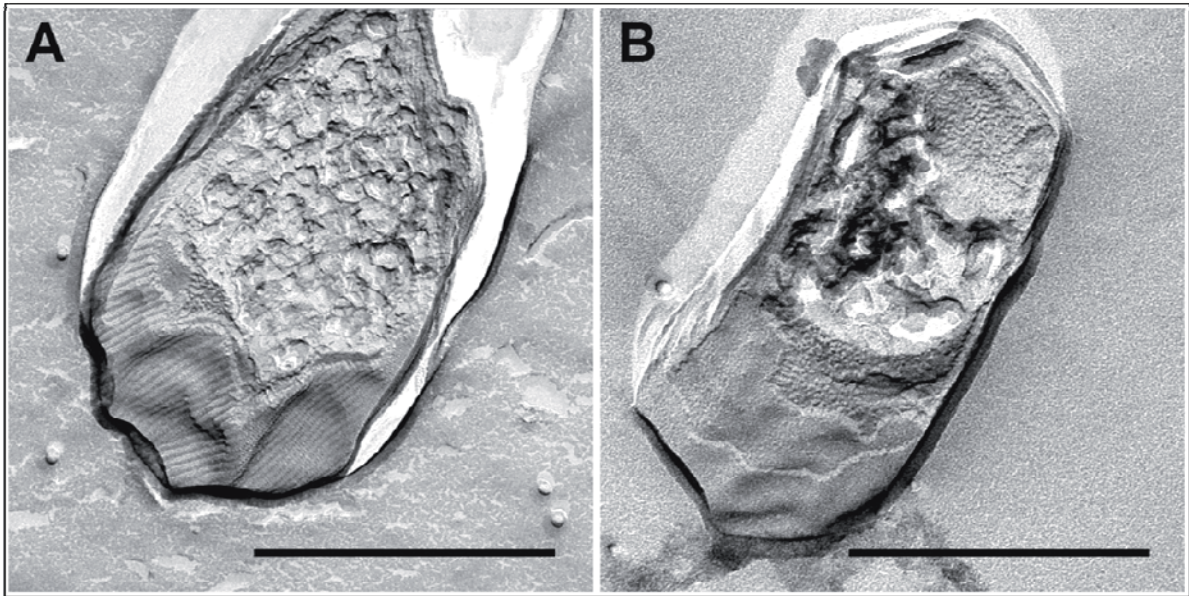


**Abbildung 23:** Zeitabhängige Veränderung des pH-Wertes beim Wachstum der Stämme SP5/1 und  $\Delta$ Slp90 auf Pyrit. Die Messung des pH-Wertes erfolgte mit Hilfe von pH-Indikatorstreifen im Rahmen der regelmäßigen Probenahmen wie unter II.6.3 beschrieben.

#### 2.2.4 Darstellung der Zelloberfläche und Aufbau der Zellwand bei den Stämmen SP5/1 und $\Delta$ Slp90

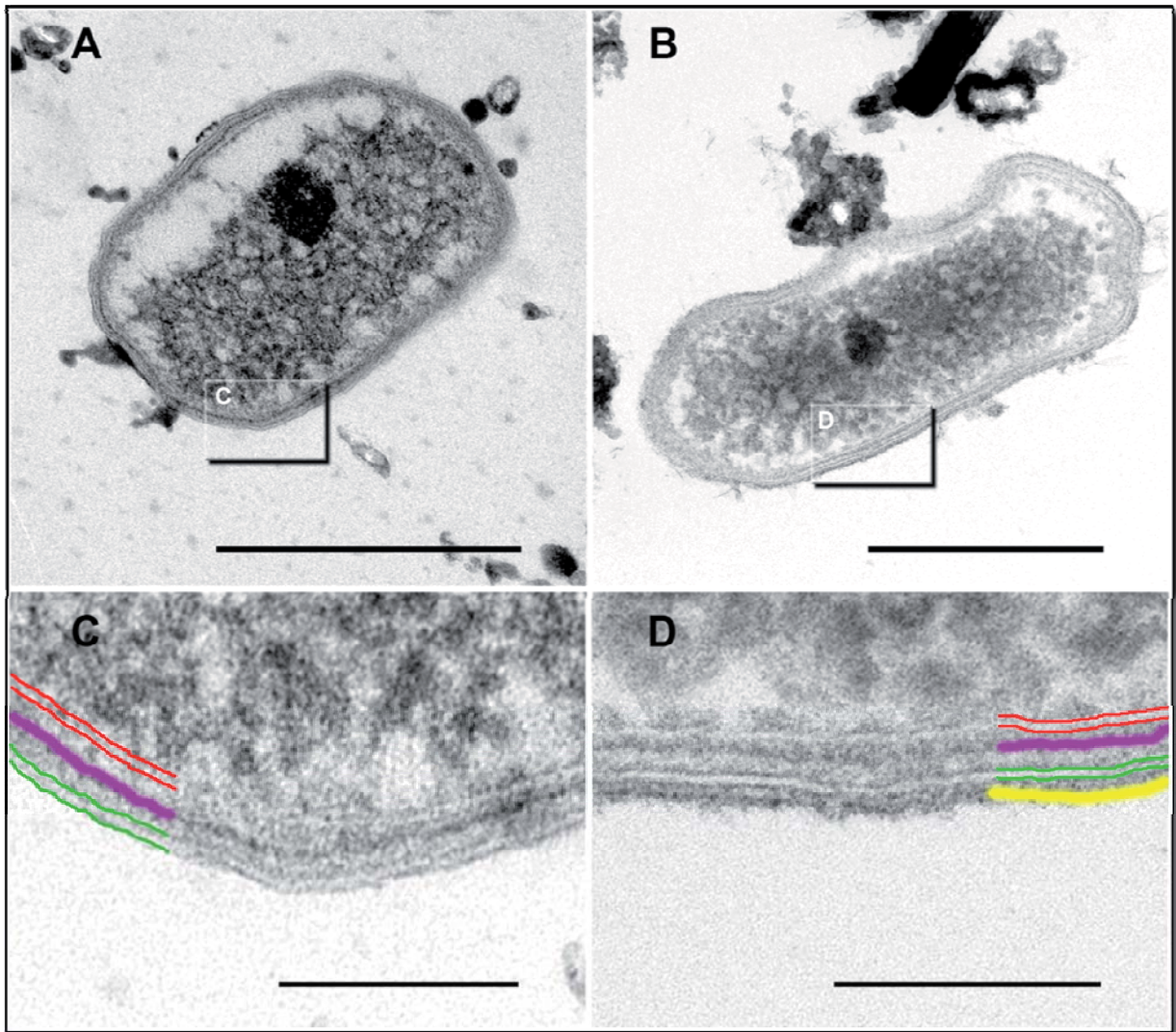
Wie bereits in Abschnitt III.2.4.1 beschrieben, war der Stamm  $\Delta$ Slp90 nicht in der Lage, einen S-Layer an der Zelloberfläche auszubilden. Aus diesem Grund erschien es sinnvoll, sowohl die Zelloberfläche wie auch den strukturellen Aufbau der Zellwand dieses Stammes vergleichend mit dem Wildtyp SP5/1 darzustellen.

Anhand von Gefrierätzungen zeigte sich, dass lediglich der Stamm SP5/1 das streifenförmige Muster an der Oberfläche aufwies, welches durch die p2-Symmetrie des S-Layers hervorgerufen wurde (Abbildung 24 A). Der Laborstamm  $\Delta$ Slp90 offenbarte hier eine relativ glatte Zelloberfläche, die vermutlich die äußere Membran darstellt (Abbildung 24 B).



**Abbildung 24:** Gefrierätzung der Stämme SP5/1 und  $\Delta$ Slp90 entsprechend II.5.2.2. (A) Streifenförmiger S-Layer an der Zelloberfläche des Stammes SP5/1. (B) Glatte Zelloberfläche des Stammes  $\Delta$ Slp90, hervorgerufen durch die äußere Membran. Balken: je 500 nm.

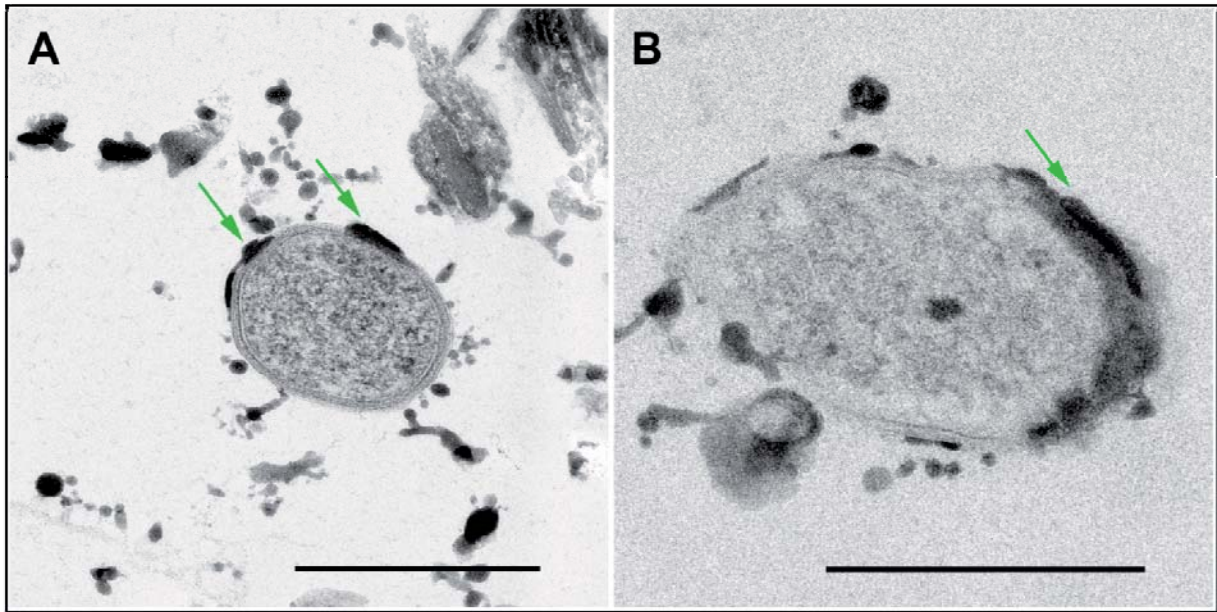
Anhand von Ultradünnschnitten an eingebetteten Zellen gelang es, den Unterschied im Aufbau der Zellwand beider Stämme auch im Querschnitt darzustellen (Abbildung 25). In beiden Organismen war das Cytoplasma von einer Cytoplasmamembran und einer äußeren Membran umgeben, welche ein Periplasma umschloss. Jedoch war der äußeren Membran nur beim Isolat SP5/1 noch zusätzlich ein etwa 10 nm dicker S-Layer aufgelagert, erkennbar als elektronendichte Schicht (Abbildung 25 D).



**Abbildung 25:** Positiv-kontrastierte Ultradünnschnitte zur vergleichenden Darstellung des Zellwandaufbaus. Die Präparation der Zellen erfolgte entsprechend II.5.2.3. Dargestellt sind die Stämme  $\Delta$ Slp90 (A) und SP5/1 (B), gewachsen auf Pyrit. Die Präparation erfolgte entsprechend II.5. (C) und (D): vergrößerte Darstellung der markierten Bereiche in (A) und (B). Farblich hervorgehoben sind die **Cytoplasmamembran**, das **Peptidoglykan** im Periplasma, die **äußere Membran** und der **S-Layer**. Balken: 500 nm (A, B) bzw. 100 nm (C, D).

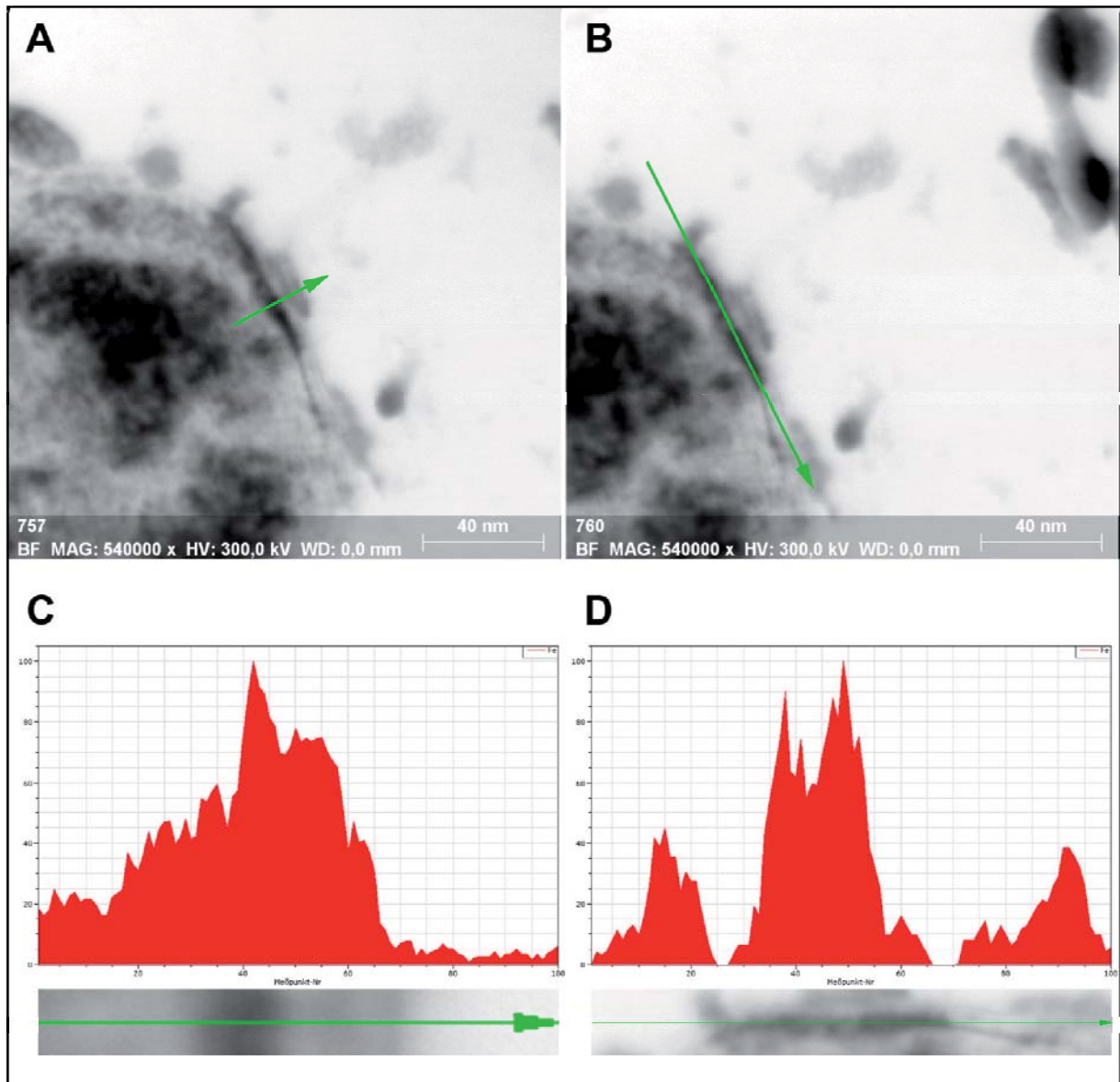
### 2.2.5 Identifizierung von komplexiertem Eisen in der Zellwand des Stammes SP5/1 mit Hilfe der EDX-Spektroskopie

An positiv-kontrastierten Dünnschnitten des Isolats SP5/1 wurden regelmäßig elektronendichte Bereiche in Form größerer Flecken an der Zelloberfläche beobachtet (Abbildung 26; grüne Pfeile). Da an dieser Stelle die Möglichkeit in Betracht gezogen wurde, dass der S-Layer an der Komplexbildung von  $\text{Fe}^{3+}$  beteiligt sein könnte, sollte mit Hilfe einer EDX-Analyse die chemische Zusammensetzung dieser Flecken aufgeklärt werden.



**Abbildung 26:** Ultradünnschnitte eingebetteter Zellen des Isolates SP5/1, gewachsen auf Pyrit. Die Präparation erfolgte entsprechend II.5.2.3. An der Zelloberfläche zeigen sich elektronendichte Bereiche in Form größerer Flecken (grüne Pfeile). Balken: je 500 nm.

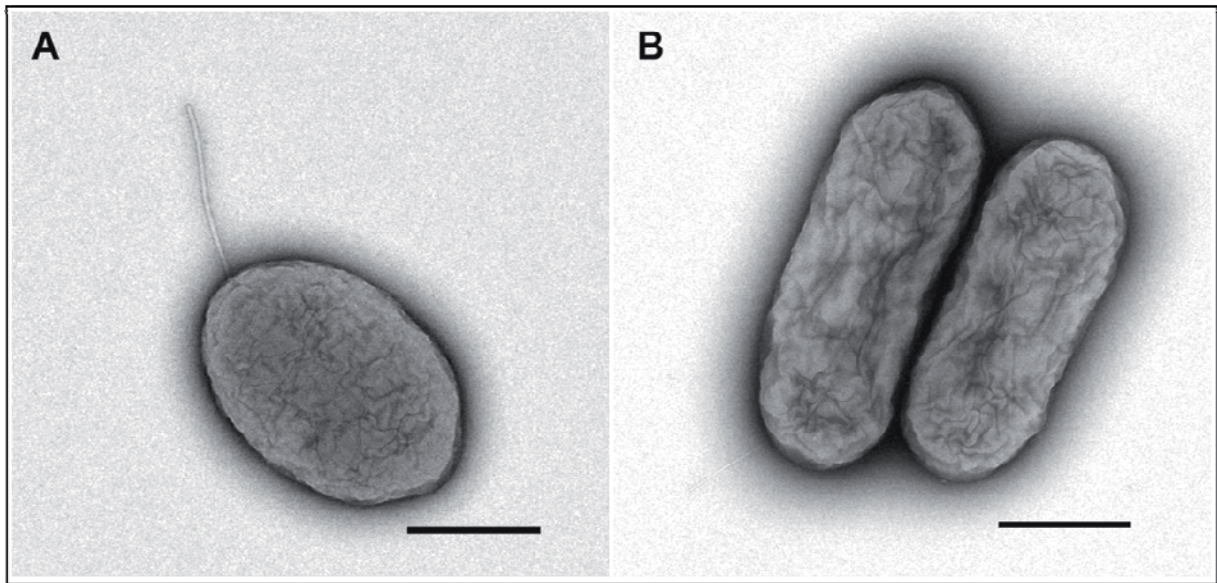
Ein Linescan entlang und quer zu diesen elektronendichten Flecken führte zu der Erkenntnis, dass diese Bereiche im Vergleich zu den sie umgebenden Bereichen signifikant höhere Mengen an Eisen enthielten (Abbildung 27). Obwohl es zu einer leichten Verschiebung des Eisenpeaks im Diagramm durch die Drift des Präparats im Röntgenstrahl kam, konnten die Maxima eindeutig den dunklen Arealen an der Zelloberfläche zugeordnet werden (Abbildung 27 C, D). Anhand des Energieverlusts der rückgestreuten Elektronen war es zwar möglich, den erhöhten Anteil an Eisen in besagten Regionen aufzuzeigen, jedoch nicht dessen Oxidationsstufe oder mögliche Komplexbindungspartner.



**Abbildung 27:** EDX-Analyse der elektronendichten Bereiche an der Zelloberfläche des Isolates SP5/1. (C) und (D): EDX-Linescans entlang der grünen Pfeile in (A) und (B) ergeben einen deutlich erhöhten Gehalt an Eisen in den elektronendichten Flecken.

### 2.2.6 Zellformerhaltende Funktion des S-Layer Proteins Slp90

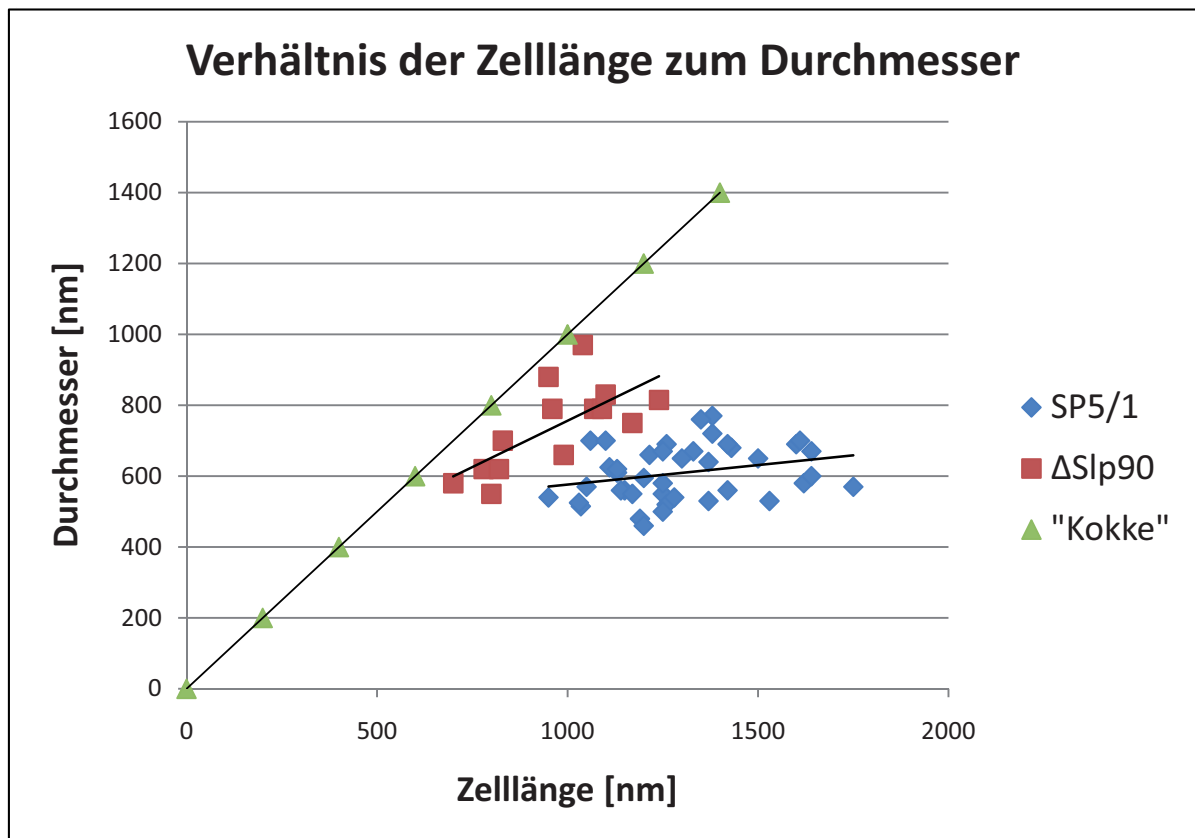
Die Beobachtung, dass in Kulturen des Laborstammes  $\Delta$ Slp90, verglichen mit SP5/1, deutlich mehr Kurzstäbchen bzw. annähernd kokkoide Zellen auftraten (Abbildung 28), legte die Vermutung nahe, dass der S-Layer eine Zellform-erhaltende Funktion haben könnte. Diese Annahme wurde zusätzlich von Beobachtung in Huber (1987) gestützt, weshalb ursprünglich der Name „*Thiobacillus sphaeroides*“ für den Stamm SP5/1 vorgeschlagen wurde.



**Abbildung 28:** Zellformerhaltende Funktion des S-Layers. (A) Suspensionspräparate des Stammes  $\Delta$ Slp90 zeigen kürzere bzw. annähernd kokkoide Zellen. (B) Im Vergleich typische Stäbchen des Stammes SP5/1. Negativkontrastierung mit UAc (II.5.2.1). Balken: je 500 nm.

Um einen Beweis für die Richtigkeit dieser Annahme zu erhalten, wurden anhand von Suspensionspräparaten im TEM für insgesamt 41 Zellen des Stammes SP5/1 und 14 Zellen von  $\Delta$ Slp90 die Zelllänge und der Durchmesser bestimmt und graphisch gegeneinander aufgetragen (Abbildung 29). Als Referenz dienten „ideale Kokken“ unterschiedlichen Durchmessers, bei denen die Länge dem Durchmesser entspricht.

Der Quotient aus Zelllänge und Durchmesser ergab für den Wildtyp SP5/1 einen Wert von 2.13. Dies charakterisierte den Stamm als typisches Kurzstäbchen. Für den Laborstamm  $\Delta$ Slp90 wurde in diesem Zusammenhang ein Wert von 1.31 berechnet. Dadurch erschienen die Zellen deutlich kokkoider und die Zellform kam einer idealen Kokke, für die der Quotient 1 betragen würde, sehr nahe. Dies zeigte sich auch bei der graphischen Darstellung (Abbildung 29), bei der die eingetragenen Werte beider Stämme deutlich voneinander abgegrenzt waren. Je näher die Punkte dabei an der Winkelhalbierenden des Koordinatensystems lagen bzw. je näher die Steigung der Mittelwertsgeraden dem Wert 1 kam, desto ausgeprägter war der kokkoide Charakter der Zellen. Aus diesem Ergebnis konnte geschlossen werden, dass dem S-Layer zwar keine Zellform-bestimmende, jedoch eine Zellform-erhaltende Funktion zukommt.

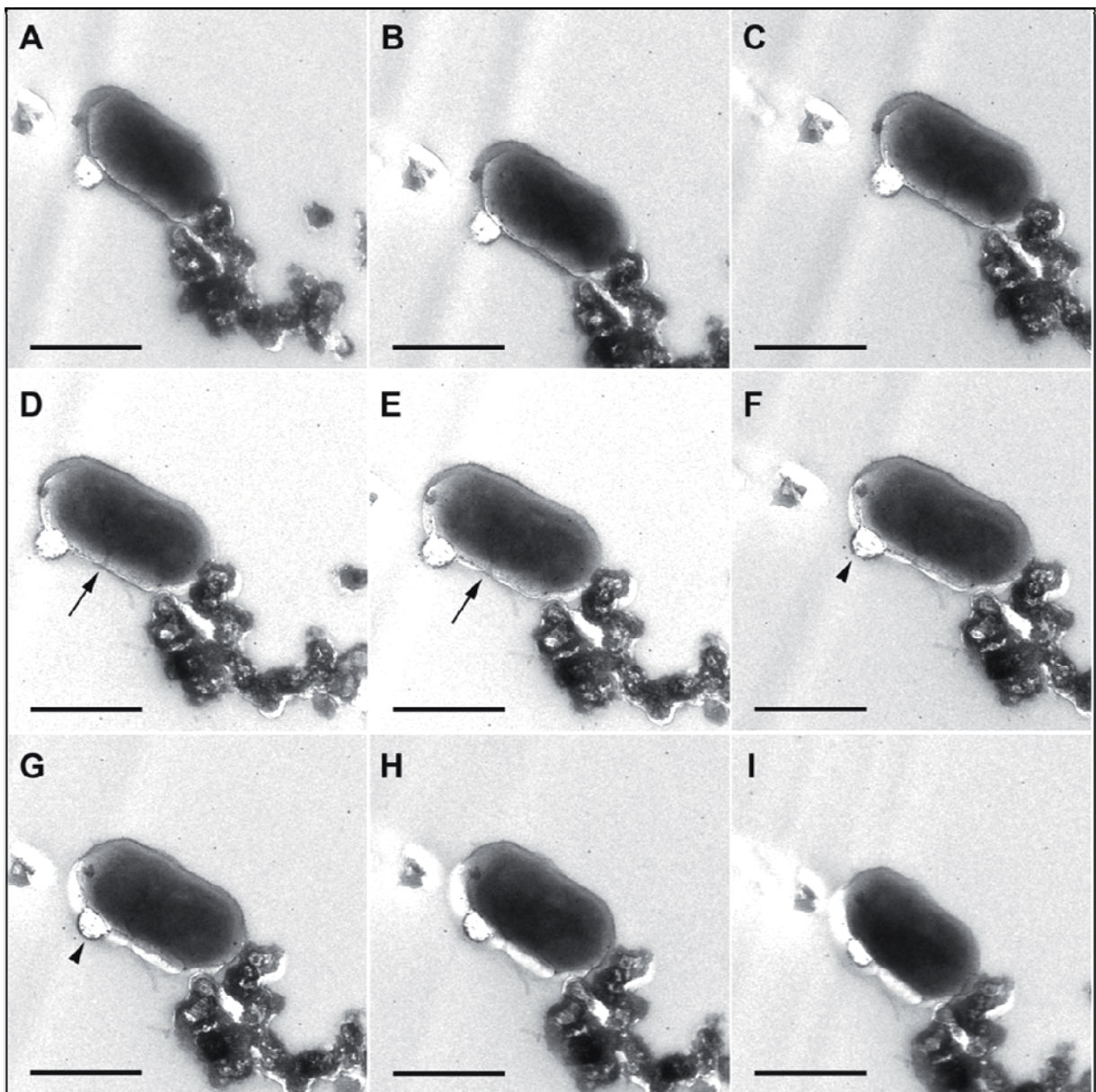


**Abbildung 29:** Verhältnis von Zelllänge zum Durchmesser in den Stämmen SP5/1 (♦) und  $\Delta$ Slp90(■). Die Abmessungen der Zellen wurden elektronenmikroskopisch ermittelt. Als Referenz dient eine „ideale“ Kokke (▲) bei der der Durchmesser der Länge entsprechen würde. Zusätzlich ist für die Werte von SP5/1 und  $\Delta$ Slp90 jeweils eine Mittelwertsgerade eingetragen.

### 2.3 Dreidimensionale Darstellung der Kontaktstelle zwischen S-Layer und Pyritoberfläche

In zahlreichen Arbeiten stand die Adhäsion von *A. ferrooxidans* auf Pyritkristallen im Fokus der Untersuchungen (Edwards *et al.*, 2000; Rohwerder *et al.*, 2003; Harneit *et al.*, 2006; Mangold *et al.*, 2008). Die in diesen Fällen üblicherweise verwendeten bildgebenden Verfahren wie Rasterelektronen- oder Rasterkraftmikroskopie sowie unterschiedliche lichtmikroskopische Techniken eignen sich in erster Linie dafür, die Zellen als Ganzes abzubilden. Als Folge daraus ist eine detaillierte Darstellung der Kontaktstelle zwischen Zelle und Kristall unmöglich oder durch das Auflösungsvermögen der jeweiligen Mikroskope begrenzt. Deshalb wurden Kippserien (II.5.2.4) von Semidünnschnitten (Dicken ca. 200 nm) in Epon eingebetteter Zellen des Isolates SP5/1, gewachsen auf Pyrit, aufgezeichnet (s.a. II.5.2.3.4) und mit Hilfe von IMOD weiter prozessiert (II.5.6). Anhand der resultierenden Elektronentomogramme konnte im vorliegenden Beispiel ein Modell der Kontaktstelle generiert werden.

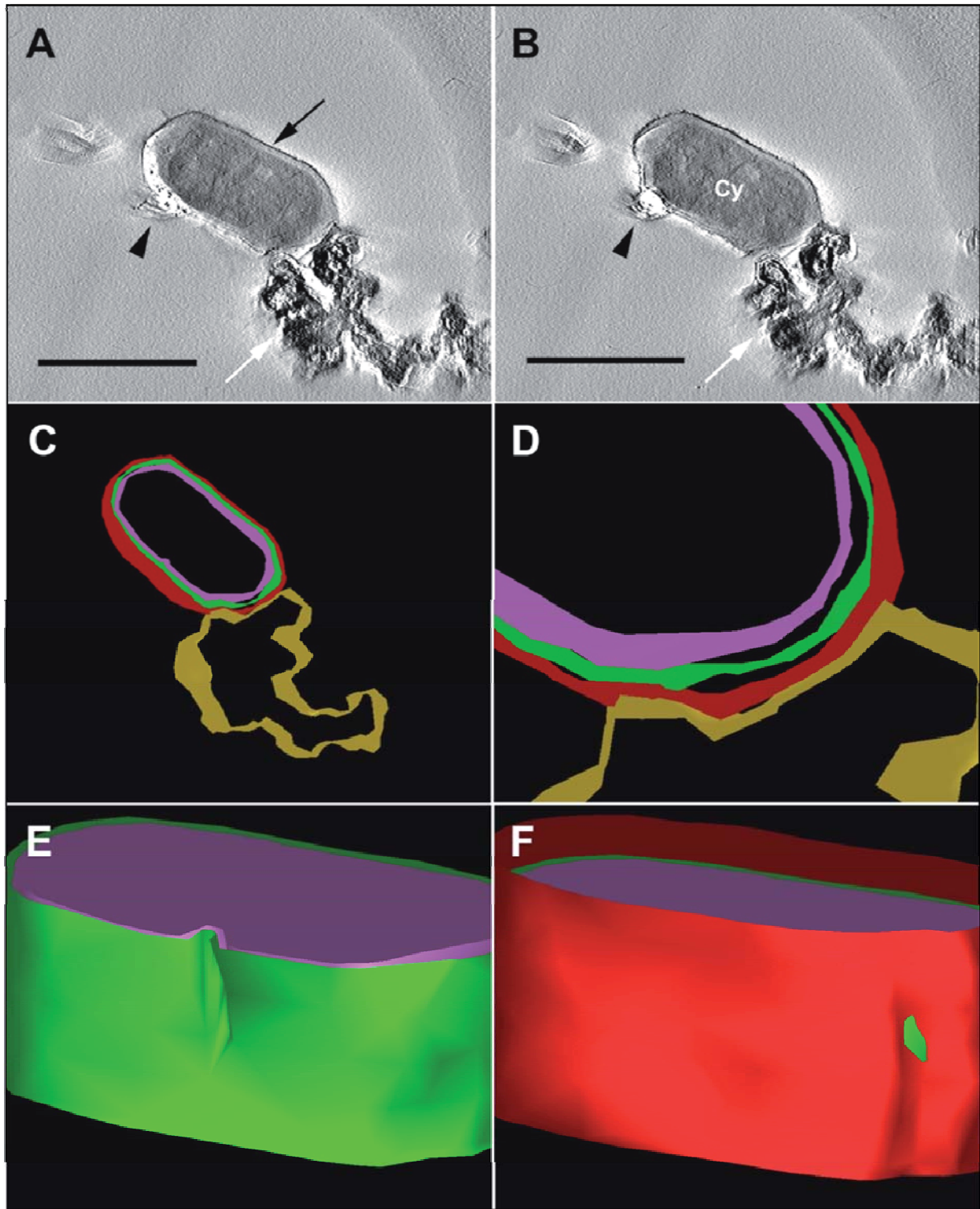
Die Kippserie der in Abbildung 30 dargestellten Serie wurde unter Verwendung der in Tilt-Serie 1 zusammengefassten Winkel aufgenommen (s.a. VII.3.3).



**Abbildung 30:** Auszüge einer Kippserie an einem Dünnschnitt des Isolates SP5/1 in Kontakt mit Pyrit. Kippwinkel (Tilt-Serie 1): (A)  $-43.57^\circ$ , (B)  $-36.04^\circ$ , (C)  $-27.77^\circ$ , (D)  $-18.87^\circ$ , (E)  $-9.53^\circ$ , (F)  $0^\circ$ , (G)  $14.24^\circ$ , (H)  $27.77^\circ$ , (I)  $39.91^\circ$ . Schwarzer Pfeil: beginnende Zellteilung; schwarze Pfeilspitze: Blase im Epon. Negativkontrastierung. Balken: je 500 nm.

Die Bilder der Kippserie wurden mit 15 nm Goldpartikeln als Referenzmarkern (II.5.2.4) mit dem Softwarepaket IMOD aligniert und daraus ein Tomogramm erstellt, das aus 50 einzelnen Schichten bestand (Kremer *et al.*, 1996; Mastronarde, 2006). In den einzelnen Ebenen konnten folgende, das Cytoplasma umgebende, Strukturen voneinander abgegrenzt werden: Cytoplasmamembran, Periplasma, äußere Membran und der S-Layer. Diese wurden - wie auch der angrenzende Pyritkristall - in jeder zweiten Schicht des Tomogramms farblich markiert und in ein Modell umgewandelt, welches eine Reihe von Informationen

bezüglich der Kontaktstelle lieferte. Die Form des S-Layers bzw. der ganzen Zelle passte sich in diesem Bereich dem Relief der Pyritoberfläche an (Abbildung 31 D bzw. F) was eine optimale Annäherung der Zelle und kurze Transportwege von  $\text{Fe}^{2+}$  oder reduzierten Schwefelverbindungen in das Periplasma gewährleistete. Dass die äußere Membran in Abbildung 31 F in einem kleinen Bereich außerhalb des S-Layers dargestellt wurde, war auf die Glättungsfunktion des Modells in IMOD über mehrere Ebenen hinweg zurückzuführen, wodurch es zu einer Überschneidung der resultierenden Flächen kam. In den einzelnen Schichten des Tomogramms war die äußere Membran stets innerhalb des S-Layers. Eine weitere Beobachtung, das Periplasma betreffend, war ein um etwa 50 % vergrößerter Abstand zwischen Cytoplasmamembran und äußerer Membran im Bereich der Kontaktstelle (Abbildung 31 A). Insbesondere in den Videosequenzen, die aus der Kippserie, dem Tomogramm und dem Modell erstellt wurden, war dieser Befund offensichtlich (Begleit-DVD; s.a. Abschnitt VII.2). Hinsichtlich des Kontrastes im Elektronenmikroskop, hervorgerufen durch eine veränderte Proteinverteilung bzw. -konzentration, kam es zu keiner erkennbaren Veränderung im Periplasma. Jedoch stellte dieser Bereich keinen leeren Raum dar, sondern war angefüllt mit Materie, die einen schwachen aber dennoch sichtbaren Kontrast verursachten (s.a. Abbildung 25). Diese bildet eine Art periplasmatisches Gel (Hobot *et al.*, 1984), welches im Normalfall bei der hier angewendeten Präparationstechnik über die gesamte Zelle hinweg eine uniforme Weite zeigen sollte (Graham *et al.*, 1991). Wie bereits anhand der Kippserie ersichtlich war, befand sich die untersuchte Zelle zum Zeitpunkt der Präparation in Teilung (s.a. Abbildung 30 D bzw. E, schwarze Pfeile). Die Einschnürung des Cytoplasmas in der Zellmitte betraf die Cytoplasmamembran und die äußere Membran (Abbildung 31 E), nicht aber den S-Layer an dieser Stelle (Abbildung 31 F). Unglücklicherweise befand sich direkt an der Membran der Zeile eine Blase im Eponharz. Da aber das Hauptaugenmerk auf der Kontaktstelle der Zelle mit dem Pyritkristall lag, wurde diese Unregelmäßigkeit im Harz ignoriert und die Markierung der Strukturen im Tomogramm in diesem Bereich interpoliert.



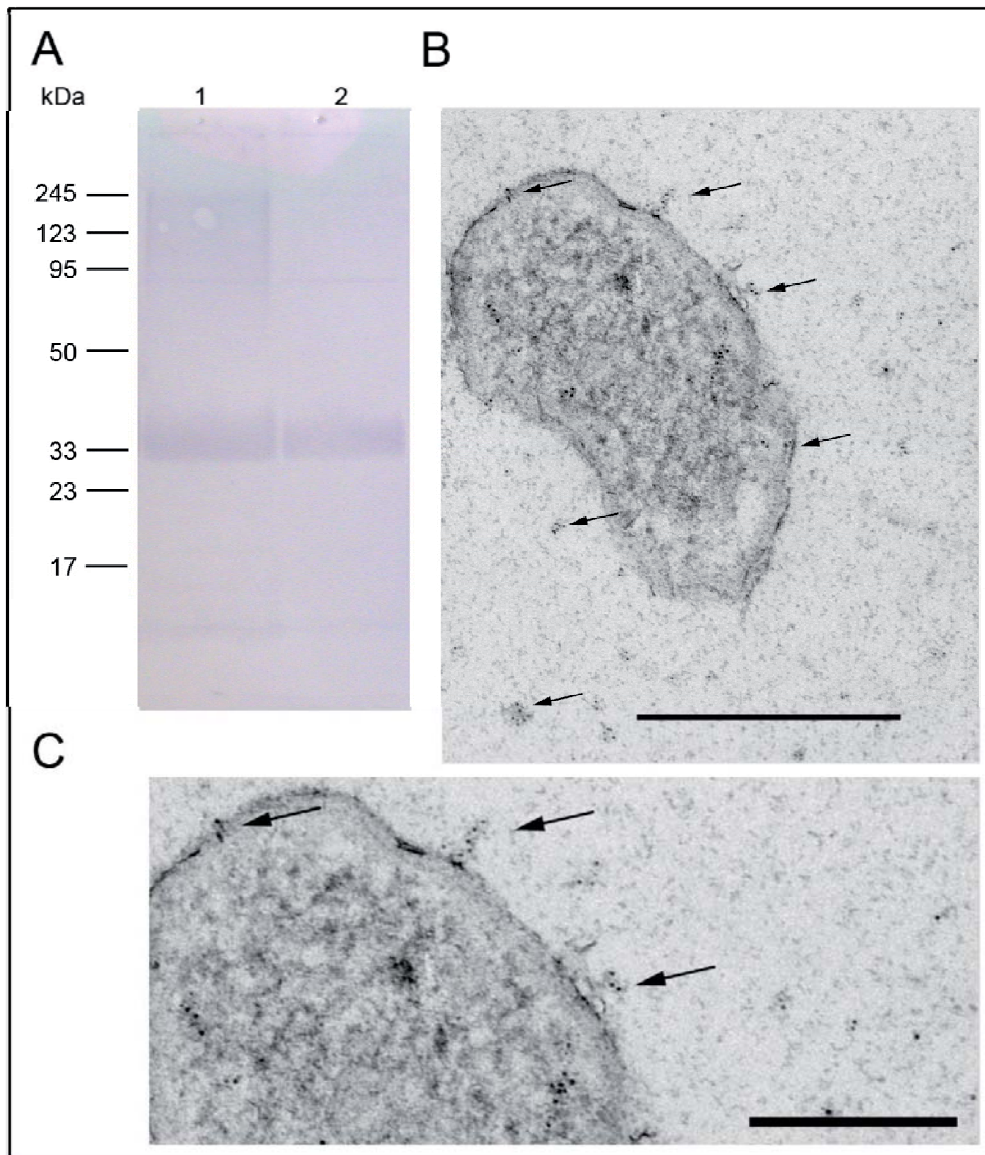
**Abbildung 31:** Tomographische Darstellung des Isolates SP5/1. Ausgewählte Schichten des Tomogramms (insgesamt 50 Schichten). (A) Schicht 48, (B) Schicht 80. Schwarzer Pfeil: S-Layer; weiße Pfeile: Pyrit; schwarze Pfeilspitze: Blase im Epon. Balken: je 500 nm. (C) bis (F): unterschiedliche Perspektiven des Modells, generiert aus dem vorliegenden Tomogramm. In (E) wurde der S-Layer für die Darstellung von Cytoplasmamembran und äußerer Membran ausgeblendet. Farbindex: Cytoplasmamembran, äußere Membran, S-Layer und Pyrit. Markierung der Strukturen in jeder zweiten Schicht.

## 2.4 Immunologische Lokalisation des S-Layers

Ein Test bezüglich der Spezifität der Antikörper gegen das S-Layer Protein Slp90 anhand eines Western-Blots führte zu drei Banden auf der PVDF-Membran. Hierbei stellt eine dünne und deutlich abgegrenzte Bande bei etwa 90 kDa den glykosylierten S-Layer dar (Abbildung 32 A). Des Weiteren kam es zusätzlich zu Kreuzreaktionen mit Proteinen bei etwa 33 und 10 kDa, wobei die Banden deutlich verschmiert und über einen größeren Massebereich verteilt vorlagen. Dabei handelt es sich entweder um den N-Terminus des unprozessierten Proteins (vergleiche auch III.2.3) mit einer theoretischen Masse von 41.75 kDa oder um ein S-Layer-assoziiertes Protein, welches bereits bei der Immunisierung der Kaninchen in den hierfür benutzten S-Layer-Präparationen vorlag. Ein proteolytischer Abbau während oder nach der Präparation des S-Layers konnte jedoch nicht ausgeschlossen werden und könnte ebenfalls zu Reaktionen der Antikörper mit den resultierenden Peptiden geführt haben. Anhand von Immunmarkierungsversuchen an Ultradünnschnitten konnte der S-Layer mit Hilfe von 6 nm Goldpartikeln (gekoppelt an den sekundären Antikörper) an der Zelloberfläche lokalisiert werden (Abbildung 32 B, C). Primäre Antikörper gegen das Gesamtprotein Afe\_2303 würden bei einer Spaltung des Proteins und einer partiellen Freisetzung des C-terminalen Abschnitts ins Medium zu den erkennbaren Antikörpermarkierungen an dieser Stelle führen. Eine Bindungsreaktion mit unprozessierten Proteinen war vermutlich ursächlich für Markierungen im Cytoplasma.

Neben einer Lokalisation des S-Layer Proteins anhand von Immunmarkierungen an Ultradünnschnitten wurde zusätzlich versucht diese Ergebnisse mit Hilfe der Freeze-fracture labeling Methode (II.8.3.1) zu bestätigen.

Die Versuche blieben allerdings erfolglos. Vermutlich wurden die entscheidenden an die Platin-Kohle-Replika anhaftenden Epitope, welche für die Reaktion mit dem primären Antikörper verantwortlich sind, beim ersten Waschschrift mit SDS entfernt oder irreversibel denaturiert.

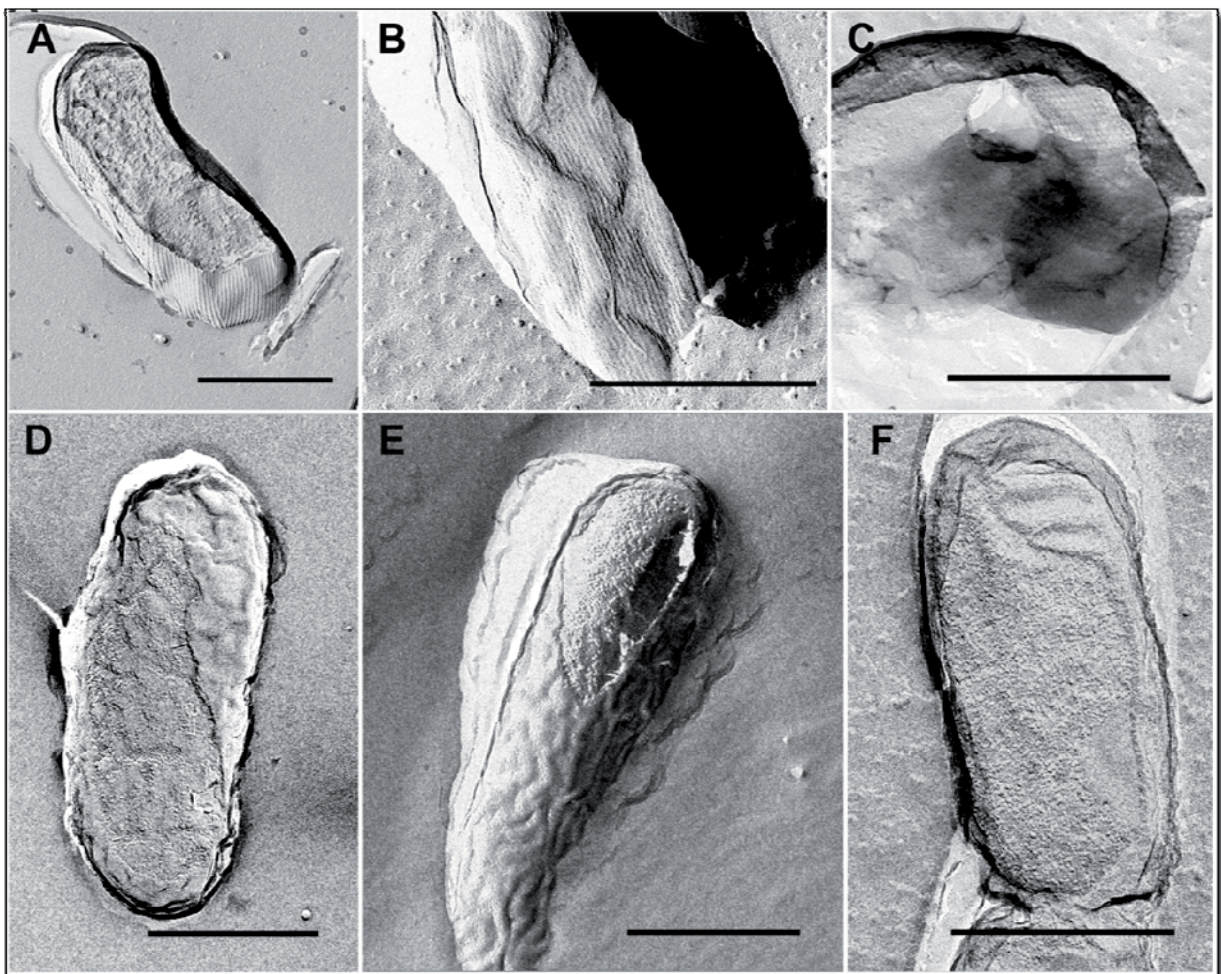


**Abbildung 32:** Immunologische Lokalisation des S-Layers des Isolates SP5/1. (A) Western-Blot mit Anti-Slp90 (1° AK, 1:1000 verdünnt; 2° AK 1:500 verd.) nach II.7.5.2. S-Layer-Präparationen mit 1 % SDS in MES-Puffer (pH 6.0) entsprechend II.7.2 von SP5/1 gewachsen auf Pyrit (Spur 1) bzw. FeSO<sub>4</sub> (Spur 2). (B) Immunlokalisierung des S-Layers an Ultradünnschnitten mit Anti-Slp90 (1° AK, 1:50 verd.) und 6 nm Gold (2° AK, 1:20 verd.). Pfeile markieren Goldpartikel an der Zelloberfläche. (C) Ausschnittsvergrößerung aus (B). Balken: 500 nm (B) bzw. 200 nm (C).

## 2.5 Vergleichende Darstellung der Oberflächenproteine ausgewählter Typstämme mit Hilfe der Gefrierätzmethode

Mit Hilfe der Gefrierätzmethode gelang es, die Zelloberfläche verschiedener *Acidithiobacillus*- und *Thiobacillus*-Stämme darzustellen und teilweise die Symmetrie bzw. Gitterkonstanten zu bestimmen. Sowohl der Typstamm *A. ferrooxidans* DSM 14882<sup>T</sup> als auch *A. thiooxidans* DSM 14887<sup>T</sup> waren von einem S-Layer mit p2-Symmetrie bedeckt (Abbildung 33 A, B). Die Bestimmung der Abmessungen dieser Strukturen zeigte, dass sie

nur unwesentlich von den Werten abweichen, wie sie für die Stämme SP5/1 und HV2/2 ermittelt wurden. Beim Stamm *A. ferrooxidans* DSM 14882<sup>T</sup> wies die Gitterkonstante a einen Wert von 15.9 nm, die Gitterkonstante b von 6 nm auf. Etwas geringer waren die gemessenen Ausdehnungen beim Stamm *A. thiooxidans* DSM 14887<sup>T</sup> mit 13.1 nm für a und 5.5 nm für b. Für den letztgenannten Stamm konnte zusätzlich die Dicke des S-Layers mit 9 nm bestimmt werden. Entgegen diesen Resultaten offenbarte die ebenfalls zu den Proteobakterien zählende Spezies *T. azoricus* HW3 einen S-Layer mit abweichender Symmetrie (Abbildung 33 C). Anhand der Beobachtungen an Gefrierätzungen wurde in diesem Fall eine p4- oder p6-Symmetrie vermutet; eine p2-Symmetrie konnte weitgehend ausgeschlossen werden, da diese zu einem streifenförmigen Muster an der Oberfläche führen würden. Lediglich mit einer äußeren Membran schienen *T. plumbophilus* Gro7, *T. prosperus* LM3 (hier nicht gezeigt) und *Thiomonas cuprina* Hö5 (DSM 5495<sup>T</sup>) bedeckt zu sein (Abbildung 33 D/E bzw. F). Aus diesem Grund ähnelt deren Zelloberfläche jener des Laborstammes *A. ferrooxidans* ΔSlp90, der ebenfalls keinen S-Layer besitzt.



**Abbildung 33:** Vergleichende Darstellung der Zelloberfläche ausgewählter Stämme mit Hilfe der Gefrierätzmethode (II.5.2.2). (A) *A. ferrooxidans* DSM 14882<sup>T</sup>. (B) *A. thiooxidans* DSM 14887<sup>T</sup>. (C) *T. azoricus* HW3. (D) und (E) *T. plumbophilus* Gro7; identisches Erscheinungsbild von *T. prosperus* LM3. (F) *T. cuprina* Hö5 (DSM 5495<sup>T</sup>). Balken: je 500 nm.

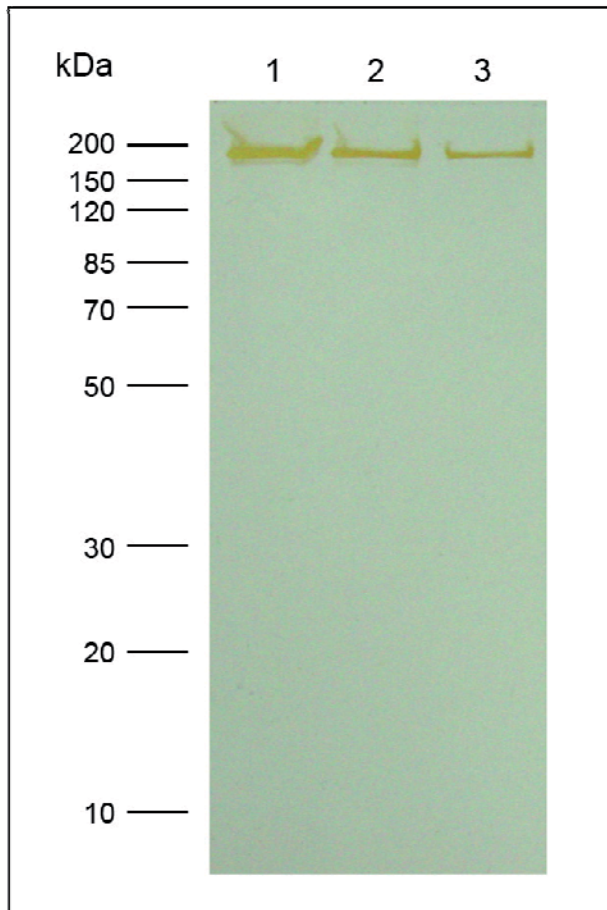
Die neu gewonnenen Daten wurden zusammen mit bereits vorhandenen in Tabelle 28 zusammengefasst. Obwohl die präsentierten Ergebnisse lediglich einen kleinen Bereich innerhalb der Proteobakterien abdecken, war es dennoch auffällig, dass S-Layer mit p2-Symmetrie bisher nur innerhalb der Gattung *Acidithiobacillus* nachgewiesen werden konnten.

Organismus	S-Layer	Symmetrie	Gitterkonstanten a; b; $\alpha$	Dicke
<i>Acidithiobacillus</i> -Isolat SP5/1	+	p2	15.6 nm; 6.3 nm; 82 °	8–10 nm
<i>Acidithiobacillus</i> -Isolat $\Delta$ Slp90	-	-	-	-
<i>A. ferrooxidans</i> DSM 14882 <sup>T</sup>	+	p2	15.9 nm; 6.0 nm	8 nm
<i>Acidithiobacillus</i> -Isolat HV2/2	+	p2	16 nm; 6.2 nm; 81.3 °	5-8 nm
<i>A. thiooxidans</i> DSM 14887 <sup>T</sup>	+	p2	13.1 nm; 5.5 nm	9 nm
<i>T. azoricus</i> HW3	+	p4/p6	-	-
<i>T. prosperus</i> LM3	-	-	-	-
<i>T. plumbophilus</i> Gro7	-	-	-	-
<i>T. cuprina</i> Hö5 (DSM 5495 <sup>T</sup> )	-	-	-	-

**Tabelle 28:** Nachweis und Gitterkonstanten von S-Layern ausgewählter Proteobakterien-Stämme. +, vorhanden; -, nicht vorhanden bzw. bisher nicht nachgewiesen.

### 3 Der S-Layer von *M. sedula* TH2

#### 3.1 Proteinsequenzierung und Analyse



**Abbildung 34:** Präparation des S-Layers von *M. sedula* TH2. Die Anzucht erfolgte unter Standardbedingungen auf Hefeextrakt (II.2.2.1). SDS-PAGE (10 % AA) zur Auftrennung und Identifikation des S-Layer Proteins (II.7.4). Die Präparation erfolgte mit 1 % SDS in MES-Puffer (pH 6.0). Die Proben wurden unverdünnt (Spur 1), 1:1 verdünnt und 1:4 verdünnt in MES-Puffer aufgetragen. Silberfärbung.

Eine Identifikation des S-Layers von *M. sedula* TH2 sollte dazu dienen, einer bereits bekannten Struktur das zugrundeliegende Protein zuzuordnen. Die gewonnenen Sequenzdaten sollten daraufhin mit weiteren *Sulfolobus*-Spezies verglichen und hieraus ein allgemeines Modell für S-Layer in *Sulfolobus* generiert werden.

Zunächst wurden dazu die Proteine einer S-Layer-Präparationen von *M. sedula* TH2 (gewachsen auf Hefeextrakt) durch eine denaturierende SDS-PAGE aufgetrennt. Die Proteinbande des S-Layers mit einer Masse von etwa 180 kDa (siehe Abbildung 34) wurde aus dem Gel ausgeschnitten und im Anschluss an einen tryptischen Verdau einer MALDI MS/MS Analyse unterzogen (II.7.6.2). Die erhaltenen Peptide konnten unter anderem anhand der NCBI-Datenbank zweifelsfrei dem hypothetischen ORF Msed\_1806 aus *M. sedula* DSM5348 (Auernik *et al.*, 2008) zugeordnet werden (*Score*: 624; *e-Value*:

2.8e-56), welches die große S-Layer-Untereinheit SlaA darstellt. Das Ergebnis wurde durch einen WU-BLAST 2 (EMBL-EBI) bestätigt. Sowohl ein NCBI-Blast als auch die Analyse mit ProtParam wies dem aus 1360 Aminosäuren bestehenden Protein eine nominale Masse von 143.47 kDa und einen *pI* von 5.21 zu. Durch das Programm SignalP 3.0 wurde bei einer Beschränkung auf Signalpeptide Gram-positiver/Gram-negativer Bakterien ein Signalpeptid mit 34/35 Aminosäuren vorhergesagt. Wählte man die Einstellung für eukaryotische Signalsequenzen betrug die Länge 22 Aminosäuren. Dieses Resultat wurde durch Phobius bestätigt. Da eine N-terminale Sequenzierung des Proteins bislang erfolglos blieb, konnte über die tatsächliche Länge des Signalpeptids keine Aussage getroffen werden. Jedoch wurde der Möglichkeit eines 22 Aminosäuren langen Signalpeptids die höhere

Wahrscheinlichkeit eingeräumt, da durch Phobius die Aminosäuren 23 bis 1360 als nicht-cytoplasmatisch angegeben wurden. Eine, durch dieses Programm angegebene, Transmembran-Region am C-Terminus inklusive eines darauf folgenden, etwa 100 Aminosäuren langen cytoplasmatischen Bereichs konnte, unter Berücksichtigung einer Analyse mit TMHMM, praktisch ausgeschlossen werden. Abgesehen von den ersten sechs N-terminalen Aminosäuren innerhalb der Zelle und einer Transmembran-Helix, bestehend aus den Aminosäuren 7 bis 29, stellte sich das restliche Protein als extrazellulär dar. Die Vorhersage der Transmembranhelix konnte mit Hilfe des Programms SOSUI, welches Msed\_1806 als Membranprotein deklariert, zwischen den Aminosäuren 7 und 28 bestätigt werden.

Für *A. ambivalens* und *S. solfataricus* konnte bereits der Nachweis erbracht werden, dass die große S-Layer-Untereinheit SlaA, welche das „Dach“ des S-Layers formt, und die kleine Untereinheit SlaB, welche den ‚stalk‘ bzw. Membrananker darstellt, in einem Operon angeordnet sind (Veith *et al.*, 2009). Getrennt werden die ORFs jeweils von einer vergleichbaren, etwa 60 bp langen Sequenz, einer sogenannten ‚intergenic region‘. Aufgrund dieser Tatsache wurde auch für *M. sedula* ein derartiges S-Layer Operon vermutet. Die Analyse des auf msed\_1806 abwärts folgenden Gens und des dazugehörigen Proteins Msed\_1807 ergab, dass es sich hierbei um das SlaB-Protein in *M. sedula* handelt. Insbesondere für den N-terminalen Bereich konnte gezeigt werden, dass für das SlaB Protein ein relativ hoher Konservierungsgrad innerhalb der Crenarchaeota vorliegt (Abbildung 46).

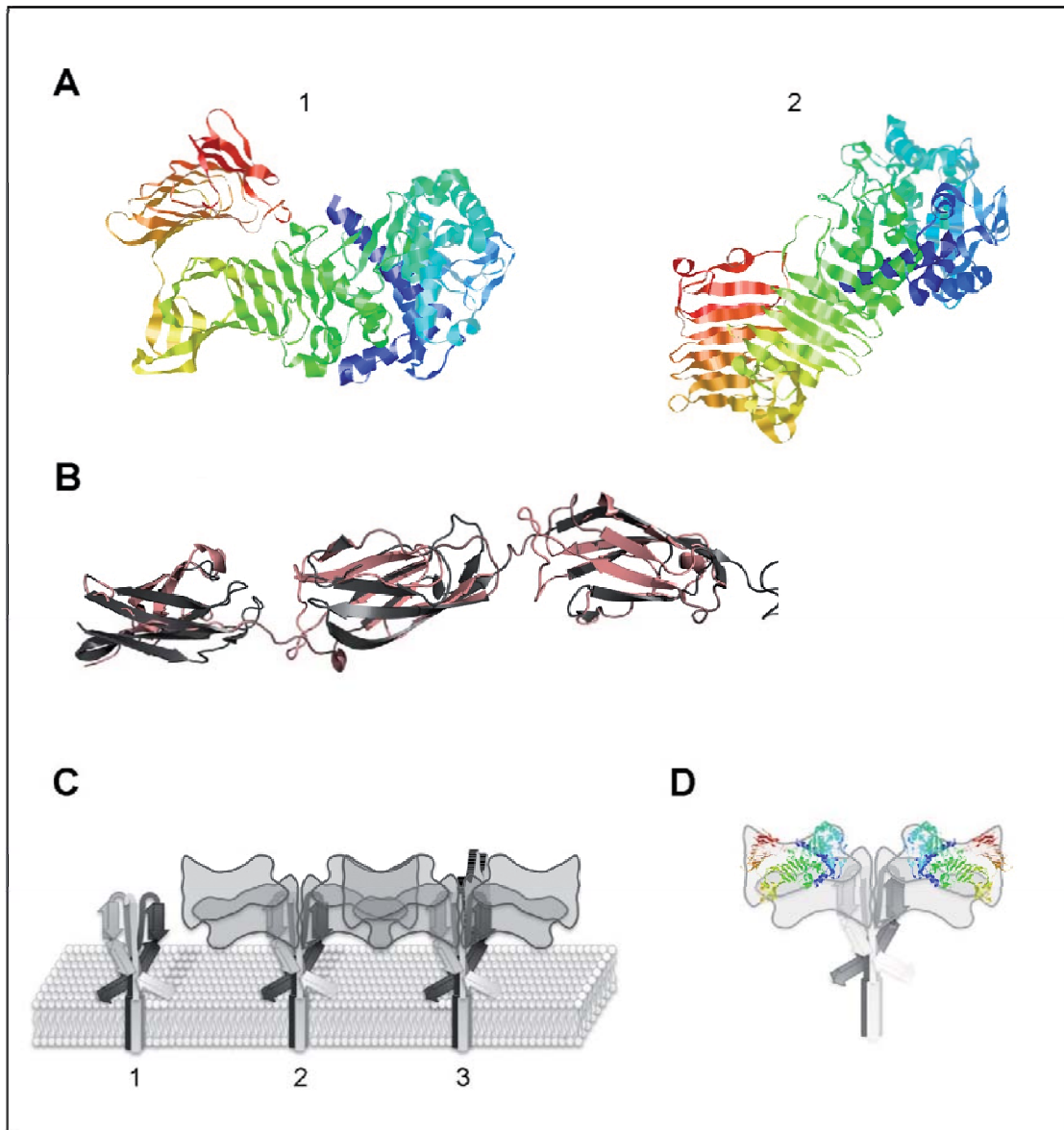
Zu den charakteristischen Eigenschaften des Proteins Msed\_1807 mit einer Länge von 416 Aminosäuren zählen eine apparente Masse von 43.43 kDa, ein theoretischer pI von 5.28 (ProtParam) sowie eine N-terminale Alpha-2-Macroglobulin Region (Pfam). Der C-terminale Bereich besaß eine Coiled-coil-Domäne, gefolgt von einem Membrananker in Form einer Transmembran-Helix (SOSUI). Für *A. ambivalens* wurde mit 3D-JIGSAW ein Modell auf Grundlage von Myosin-5 A aus der Maus erstellt, aus dem ersichtlich wurde, dass die Coiled-coil-Domäne eine schwach gebogene  $\alpha$ -Helix bildet, bei der sämtliche hydrophoben Aminosäuren auf eine Seite wiesen (Abbildung 46 B).

Eine weitere TM-Helix fand sich innerhalb des Signalpeptids, welches die ersten 29 Aminosäuren umfasste (SignalP; eukaryotische Signalsequenzen). Zwischen Aminosäure 225 und 247 wurde eine dritte TM-Helix angegeben (sekundär), die jedoch vermutlich nur einen  $\alpha$ -helikalen Bereich beschreibt.

Die höchste strukturelle Übereinstimmung mit *e-values* von  $10^{-10}$  lieferte Invasin aus *Yersinia pseudotuberculosis* (PDB identifier 1cwv; Hamburger *et al.*, 1999). Für *M. sedula*, wie auch für *A. ambivalens*, *S. acidocaldarius* und *S. tokodaii*, wurden drei dieser Beta-sandwich-Domänen vorhergesagt, für die kürzeren Proteine aus *S. solfataricus* und *S. islandicus* zwei

Domänen (Abbildung 46 A). Gestützt wurde dieses Ergebnis von Sequenzvergleichen der unterschiedlichen SlaB Proteine (Abbildung 46 C; Veith *et al.*, 2009).

Mit Zuhilfenahme des PHYRE Servers wurde ein Modell der Proteine Msed\_1806 und Msed\_1807 generiert. Die Berechnung der Struktur von Msed\_1806 erfolgte auf Basis der Kristallstruktur der extrazellulären Lipase aus *Pseudomonas sp.* MIS38 (*e-Value*: 1.9e-18); die Basis für das Modell von Msed\_1807 stellte Invasin aus *Yersinia tuberculosis* dar. Anhand dieser Strukturmodelle konnte mit Hilfe von Korrelationsmittelungen an Zellwandquerschnitten ein 3D-Modell einer für *Sulfolobus* typischen Zellwand erstellt werden. Hierbei bildet ein Trimer aus SlaB-Einheiten den ‚stalk‘, welcher aus den Beta-Sandwich-Domänen, der Coiled-coil-Domäne und dem C-terminalen Membrananker aufgebaut war (Abbildung 35 C). Durch molekulare Wechselwirkungen ist der Stalk mit dem Dach des S-Layers verbunden, welches jeweils aus einem Trimer von SlaA-Dimeren (Msed\_1806) bestand. Die schematische Form des SlaA-Proteins entstand auf Grundlage von Berechnungen aus diversen EM-Bildern (siehe auch Veith *et al.*, 2009). Um die Qualität des berechneten Modells von Msed\_1806 einordnen zu können, wurde es graphisch in das Schema der SlaA-Dimere eingepasst, was zu einer relativ hohen Deckungsgleichheit führte (Abbildung 35 D).

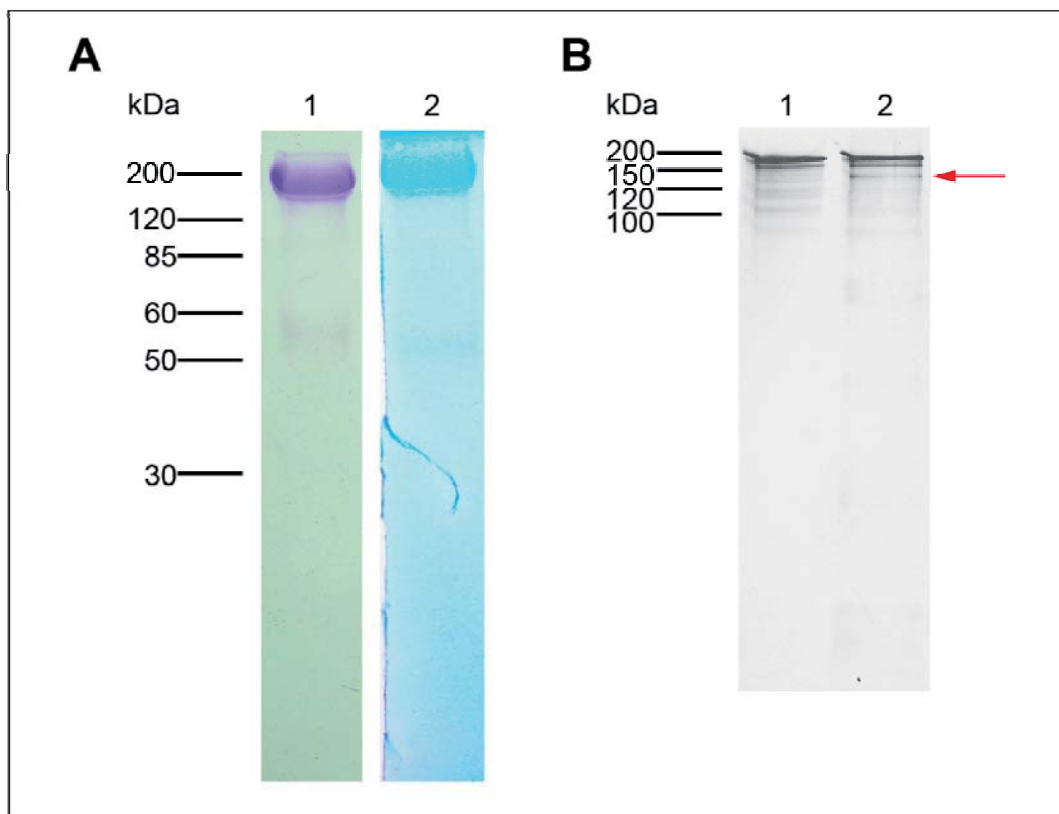


**Abbildung 35:** 3D-Modelle der S-Layer-Untereinheiten von *M. sedula*. (A) 3D-Modell des SlaA Proteins Msed\_1806 von *M. sedula* aus zwei unterschiedlichen Perspektiven (1, 2); generiert mit Hilfe des Phyre Servers mit der Kristallstruktur der extrazellulären Lipase von *Pseudomonas sp.* MIS38 (2Z8X) als Template. (B) 3D-Modell des SlaB Proteins Msed\_1807 (rot) von *M. sedula* mit *Y. tuberculosis* Invasin (1cwv) als Template (grau) unter Verwendung des Phyre Servers (Veith et al., 2009). (C) Hypothetisches Modell eines S-Layers, typisch für die Sulfolobales, generiert anhand von Modellierungen und EM-Bildern: (1) Modell des SlaB-Trimers inklusive der C-terminalen TM-Helix, der Coiled-coil- und der drei Beta-sandwich-Domänen (gezeigt sind zwei Monomere); (2) SlaB wie in (1) mit zwei SlaA Dimeren (Form entsprechend der Korrelationsmittelungen); (3) wie (2), nur mit drei SlaA Dimeren. (C) Korrelationsmittelung an einem Ultradünnschnitt des S-Layers von *S. shibatae*. (B) und (C) zur Verfügung gestellt von A. Kletzin (Veith et al., 2009). (D) Modell 2 aus (C), in welches das Modell von Msed\_1806 (A, Perspektive 1) zur Veranschaulichung eingefügt wurde.

### 3.2 Nachweis der Glykosylierung

Aufgrund der Tatsache, dass das SlaA Protein von *M. sedula* bei einer SDS-PAGE eine apparente Masse von 170 bis 180 kDa zeigte, eine Analyse der Aminosäuresequenz jedoch

eine Masse von 143.5 kDa ergab, lag die Vermutung einer starken Glykosylierung des Proteins nahe. Dies konnte bereits für zahlreiche archaeelle S-Layer gezeigt werden (König *et al.*, 2007). Im Anschluss an eine SDS-PAGE der isolierten S-Layer Proteine zeigten sowohl eine PAS-Färbung, wie auch eine Alcianblau-Färbung eine intensive Farbreaktion im Bereich von 180 kDa und zusätzlich eine schwach gefärbte Bande bei etwa 55 kDa (Abbildung 36 A). Durch diese Färbemethoden war ein Nachweis reduzierender Gruppen, wie sie in Zuckern vorliegen, möglich und stützte somit die Annahme, es handle sich bei Msed\_1806 um ein Glykoprotein. Bekräftigt wurde diese Theorie durch die erfolgreiche Deglykosylierung des Proteins mittels HF-Pyridin, bei der von einem kleinen Teil der in Lösung befindlichen S-Layer Proteine der Zuckeranteil abgespalten wurde. Dies führte zu einer zusätzlichen Bande im SDS-Gel, deren apparente Masse von etwa 145 kDa dem berechneten Wert für Msed\_1806 entsprach (roter Pfeil, Abbildung 36 B).



**Abbildung 36:** Nachweis der Glykosylierung des S-Layer Proteins Msed\_1806. SDS-PAGE (10 % AA) zur Auftrennung der denaturierten Proteine (II.7.4). (A) Nachweis reduzierender Gruppen mit Hilfe einer PAS-Färbung (Spur 1) bzw. Alcianblau-Färbung (Spur 2). (B) Deglykosylierung des S-Layers mit HF-Pyridin (Silberfärbung). Der rote Pfeil markiert das deglykosylierte Protein (Spur 2). Als Referenz diente eine unbehandelte S-Layer-Präparation.

Eine mögliche Bindung der Glykanketten an das Aminosäuregrundgerüst könnte entweder N-glykosidisch an Asparagin oder O-glykosidisch an Serin bzw. Threonin erfolgen. Aus diesem Grund wurde die Sequenz von Msed\_1806 mit den CBS-Servern NetNGlyc 1.0 und NetOGlyc 3.1 untersucht und die möglichen Bindungsstellen in der im Folgenden

angeführten Aminosäuresequenz entsprechend gekennzeichnet. Bei einer N-glykosidischen Bindung lag Asparagin stets innerhalb der Sequenz Asn-Xaa-Ser/Thr vor (blau). Es wurden ausschließlich diejenigen Aminosäuren markiert, für die Wahrscheinlichkeit einer N-Glykosylierung über 50 % lag (rot). Lediglich an dem Threonin-Rest (grün) an Position 115 wurde eine O-Glykosylierung in Betracht gezogen. Hervorgehoben wurde außerdem das, in Abschnitt III.3.1 erwähnte, 22 Aminosäuren lange Signalpeptid (gelb).

```

MNKSAIRYLSLLLFLMGGSFLAGITTFGQTSSTAGGVTISVSNEWVGNDTVVLVAIYNPNVPQSAQGAKYVAGNVTISA 80
GGVTVPLISNDTSNASVYYLNNQHYFWFFITMTPVPTTSASSLSMTETLTINSTSTNVQLTNPYLSFTTPVGNVQTDG 160
KAGVFQLTLPSSFPNQLIGEYQTVYGGHKVNITDLYFFSGDKTITISYSTGASVTINNYLADSSNYAATLQTTTESTVPL 240
NSTWQVYFVDNIMQANPLVGGNGGFMITANGTQVSPVIQNVSYLAVKNGVYVNTTVFANNPVPNAQAMFGYGNVYGNFT 320
MYTSSIVTNKTYATLLSGNNYTPANVSFSQYKMLITSGLFNTNTPTIYLSDWIGNNASVSIKGTIKETTLQSITLSVQK 400
GENLTVNDFNNISNYSVRRNIMVYVALQNITGSTYKTAMVSLPETYAGSGVFSLPTVLRIGSSPSITYSTSQVTTITLPPY 480
DFSNTSLITATNDIGASYYYLGSNTVKNISTPGTISVGTPTLVPIPNVVSANVTPIELAYTEPNLAFGTATTLTVSG 560
TSVKYNGVQVATDSVTAVLPNGTVISGNLNGLSITSLTSANGNTFFIVVPSTVIKTFLGHTYIPSGTELTFKIYDEFA 640
AQTLSTVYKFTTVAPVIAIKTPTSTSFSSAETAYLPLPYNVVPEKHYSVNVTDTLYAQSVPSALQTTLKIIVENPAG 720
QKGVNVVTTVVSETAANGLFTGKIYYTVYENSSGYWLNINGQNITNLKNVNGGLIVFEYTPSSQSTVNATALLEPSP 800
FTLSVSQTSANPGQHVNVSVNSPGLVLESSNMKFTGSLIIYAQFAEWNGPGSQPTIAVSPITLKEVSAGSPVFGGTIVLGN 880
SSVSSGNLTSLITTPGYTVAPGSVVLVNANATIGPTSTSSSITPYQQQSISINVDINVSILNPSPASPFKLEIELQ 960
SPLFNLLTHPAAGNYTSAGTSAGILEGILSTITTTQQSQQLVTSTQLVTSFKTSFYYNTIWVIETPMTLWSGTPGSYGIP 1040
IEVNLTDLLLTVTHNVYAIHVVEVPNVTTGTVSLVSAYAVPSVSSNVAQLQINGLVPPVISVFFNGNNITQSASAAIPFPN 1120
TTAGELVNVTVYAPDAVNNLNVPGSGTTFNVTIVNTANGETTTTLTLQMTKIIGGVAVPTPYTGLLKVVEPTVYTPGTP 1200
GVISASSGVVNKVLVNMNLVEGQYYNTQGLLQQLRMKASSYFYGVIKLSVLVSHFTILSNGTPVTGMQVQKSYSLLFNV 1280
TNNGNVNETIYGTLEVLLNGTPVQPEIVAQITLAPGQSTQIGTLFTPTMPGSYTTITFIPFQNNLLSIPYNQGLTEVVTAS 1360

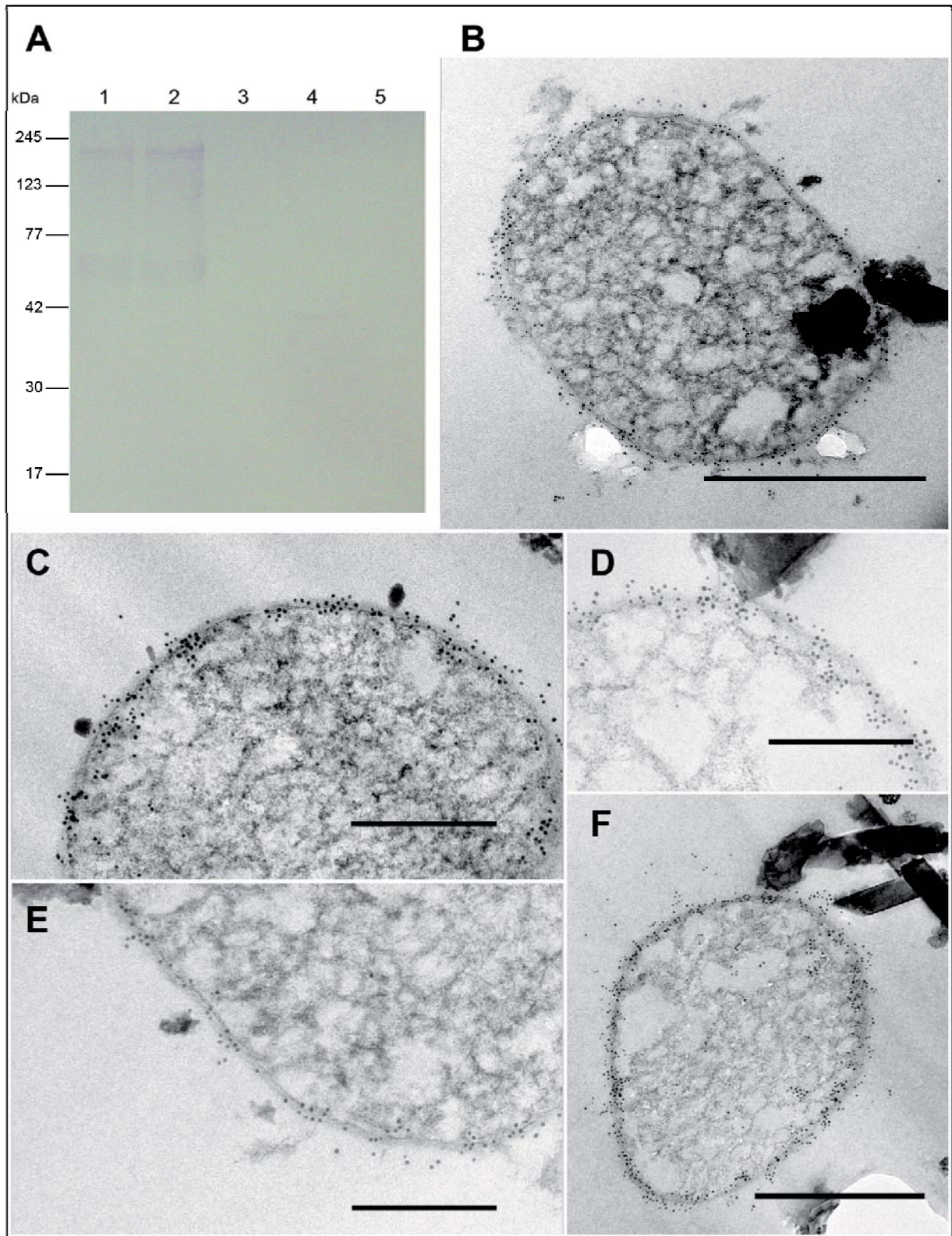
```

### 3.3 Immunologische Lokalisation und Freeze-fracture labeling

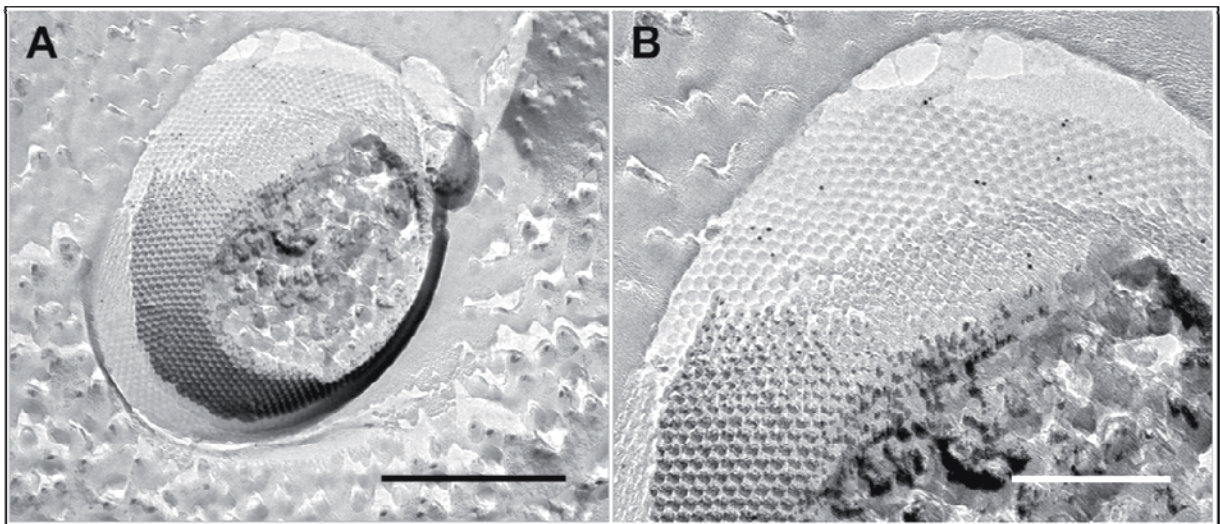
Um die Spezifität der Antikörper gegen das SlaA Protein aus *M. sedula* TH2 zu überprüfen wurde ein Western-Blot durchgeführt (II.7.5). Hiermit konnte eine Doppelbande bei 180 kDa detektiert werden, welche durch die große Untereinheit des S-Layers gebildet wurde (Abbildung 37 A). Zusätzlich war eine weitere schwache Bande bei 50 bis 55 kDa zu sehen, bei der die Vermutung nahelag, dass diese die kleine S-Layer-Untereinheit SlaB darstellte. Kreuzreaktionen mit S-Layer Proteinen einer nahe verwandten *Sulfolobus*-Spezies *S. metallicus* Kra23, sowie der Gram-negativen Bakterienstämme SP5/1 und HV2/2 wurden ausgeschlossen, da in S-Layer-Präparationen dieser Organismen keine Bindungsreaktionen zu beobachten waren (Abbildung 37 A). Basierend auf den Vorabuntersuchungen, welche die Spezifität der Antikörper betrafen, wurde versucht, das S-Layer Protein immunologisch zu lokalisieren. Anhand von Ultradünnschnitten konnten durch eine Kombination von anti-Msed\_1806 (1:500 verdünnt) und einem sekundären Antikörper goat anti-rabbit IgG (1:20 verd.), gekoppelt an 6 nm Gold gezeigt werden, dass sich der S-Layer an der Zelloberfläche befand (Abbildung 37 B). Die Streuung der Goldpartikel in einem kleinen Bereich um die Cytoplasmamembran wurde durch die Größe des Komplexes aus primärem und

sekundärem Antikörper und dem Gold hervorgerufen (Abbildung 37 C, E). Gebundene Antikörper innerhalb des Cytoplasmas waren auf S-Layer-Untereinheiten zurückzuführen, welche an dieser Stelle translatiert und weiter prozessiert werden (Abbildung 37 F). Markierte Proteine im Bereich der Kontaktstelle zwischen Zelloberfläche und Pyritkristall offenbarten eine Beteiligung des S-Layers an der Interaktion mit der Erzoberfläche (Abbildung 37 D).

Bestätigt wurden die Ergebnisse hinsichtlich der Lokalisation von Msd\_1806 an der Zelloberfläche mit Hilfe der Freeze-fracture labeling Methode nach Fujimoto (1995). Hierbei werden organische Zellbestandteile beim ersten Reinigungsschritt nicht mit Schwefelsäure, sondern mit einer SDS-Lösung behandelt. Dadurch verbleiben mögliche Epitope, welche für eine Bindungsreaktion mit dem primären Antikörper in Frage kommen, an der Replika und können so immunologisch nachgewiesen werden. Auch hier war es möglich, den S-Layer zu markieren und gleichzeitig zu zeigen, dass das regelmäßige Proteingitter an der Zelloberfläche aus dem SlaA Protein aufgebaut war (Abbildung 38). Die im Vergleich zu Ultradünnschnitten geringere Anzahl an gebundenen Goldpartikeln war bedingt durch den Waschschrift mit SDS und die Zugänglichkeit der Epitope am Oberflächenabdruck.



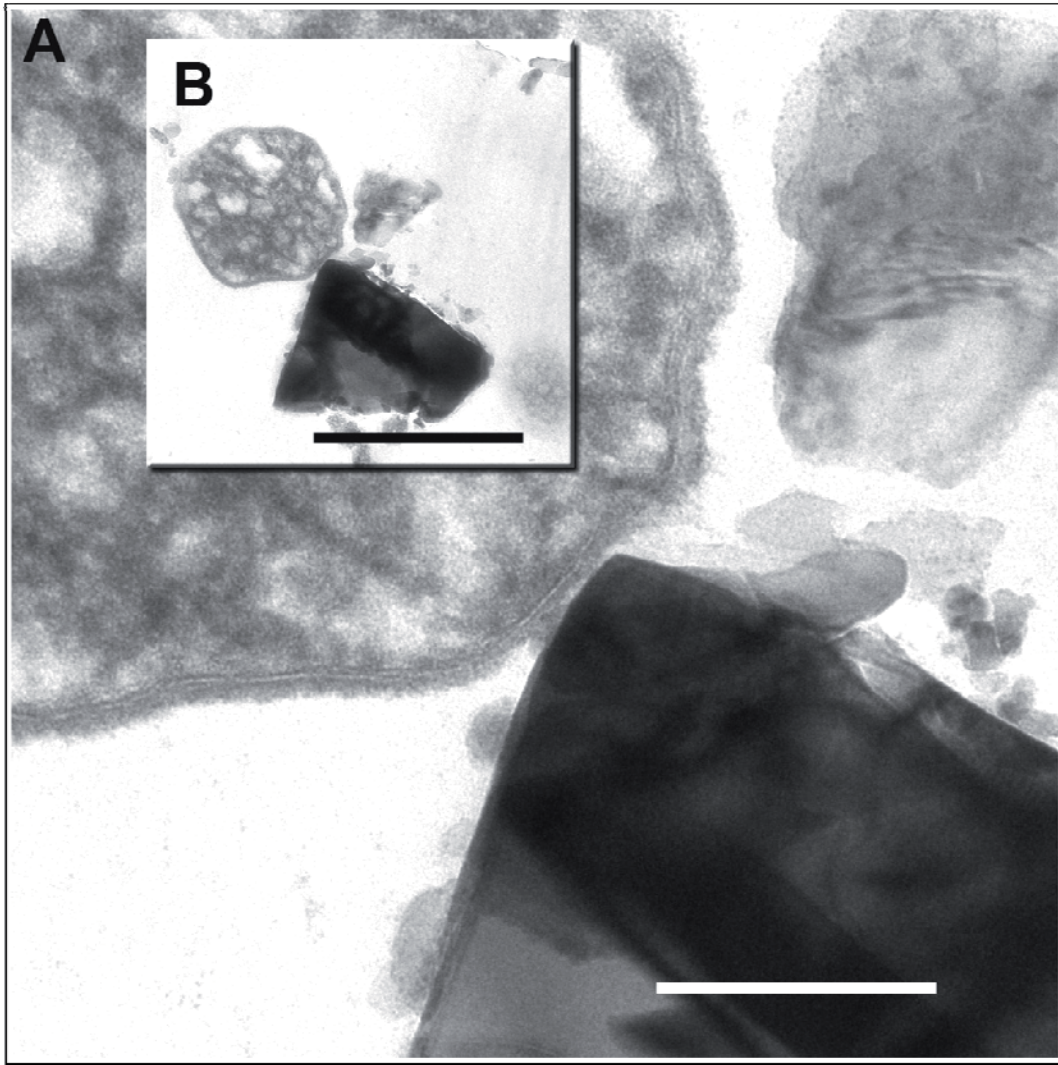
**Abbildung 37:** Western-Blot und Immunmarkierung an Ultradünnschnitten mit rabbit anti-Msed1806. (A) Western-Blot (II.7.5.2) mit rabbit anti-Msed1806 1:5000 (2° AK 1:2500); S-Layer Präparationen von *M. sedula* TH2, gewachsen auf Hefeextrakt (Spur 1) bzw. „Knallgas“ (2), *S. metallicus* Kra23 auf Pyrit (3), *Acidithiobacillus*-Isolat SP5/1 auf G1N (4) und HV2/2 auf Pyrit (5). (B-F) Immunmarkierung an Ultradünnschnitten (II.8.3.2) von *M. sedula* TH2 auf Pyrit; 1° AK rabbit anti-Msed1806 (1:500), 2° AK goat anti-rabbit IgG + 6 nm Gold (1:20). Balken: 200 μm (C-E) bzw. 500 μm (B, F).



**Abbildung 38:** Freeze-fracture labeling an Gefrierbruch von *M. sedula* TH2 (a). Immunmarkierung des S-Layers (II.8.3.1) mit rabbit anti-Msed1806 (1:50) und goat anti-rabbit IgG + 6 nm Gold (1:20). (B) Vergrößerte Darstellung des S-Layers aus (A). Balken: 500 nm (A) bzw. 200 nm (B).

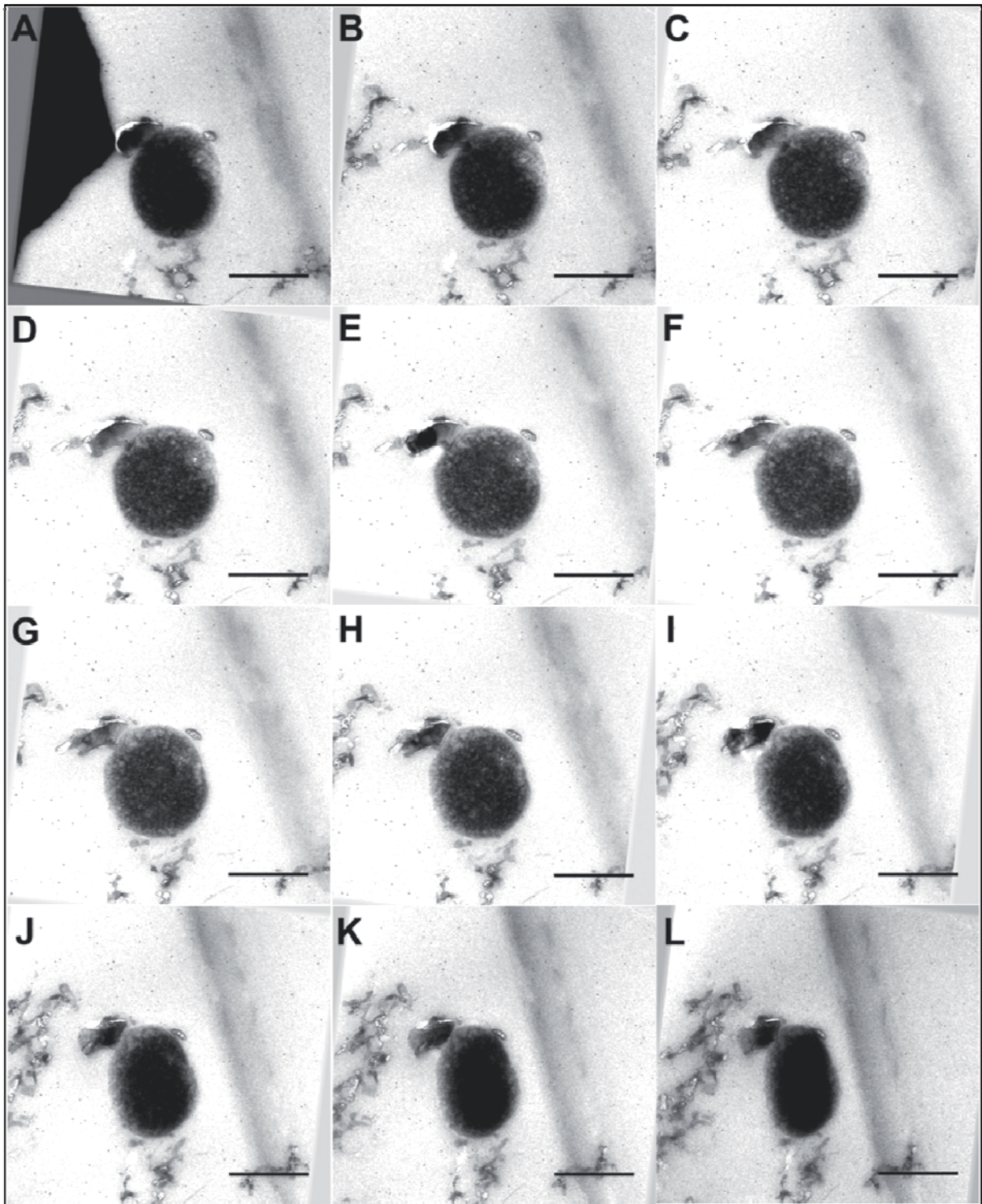
### 3.4 Dreidimensionale Darstellung der Kontaktstelle zwischen S-Layer und Pyritoberfläche

Im Rahmen früherer Arbeiten konnte eine Interaktion mit bzw. eine Adhäsion an Pyrit bereits dargestellt werden (u.a. Larsson *et al.*, 1993; Klingl, 2007; Mikkelsen *et al.*, 2007; Etzel *et al.*, 2008). Aus Ultradünnschnitten war ersichtlich, dass, auf die Cytoplasmamembran folgend, lediglich eine elektronendichte Schicht in Form des S-Layers folgt (Abbildung 39). Da bei *M. sedula* praktisch nie Zellanhänge beobachtet wurden, erschien es sinnvoll, das regelmäßige Oberflächenprotein bzw. dessen Glykananteil als Adhäsionsstruktur in Betracht zu ziehen. Die Kontaktstelle mit dem Pyritkristall wurde elektronentomographisch dargestellt und im Anschluss daran aus den Daten mit IMOD ein Modell generiert.



**Abbildung 39:** Ultradünnschnitt von *M. sedula* in Kontakt mit einem Pyritkristall. (A) Vergrößerte Darstellung einer *M. sedula* TH2 Zelle (B), die unter Standardbedingungen (II.4.2) auf Pyrit gewachsen war. Der Fokus lag dabei auf der Kontaktstelle zwischen der Zelloberfläche (S-Layer) und der Pyritoberfläche. Die Präparation erfolgte entsprechend II.5.2.3. Balken: 200 nm (A) bzw. 1  $\mu$ m (B).

Eine Tomographie erfolgte an einem Semidünnschnitt (200 nm) einer zu Abbildung 39 vergleichbaren Zelle in Kontakt mit einem Pyrit-Kristallit (Abbildung 40). Die für die Kippserie verwendeten Winkel wurden unter Abschnitt VII.3.3 in der Tilt-Serie 1 zusammengefasst. Als Referenzmarker dienten 15 nm Goldpartikel die entsprechend II.5.2.4 direkt auf die Dünnschnitte aufgebracht wurden. Teilweise sind diese auf den Kippbildern als kleine, dunkle Punkte erkennbar (Abbildung 40 H). Nachdem die Daten aufgezeichnet waren, erfolgte die Auswertung der Bildserie mit Hilfe des Softwarepakets IMOD (vergleiche III.2.4). Ausgewählte Bilder der alignierten Kippserie sind in Abbildung 40 dargestellt. Aus dem gesamten Datensatz wurde mit dem QuickTime Player eine Filmsequenz generiert, welche sich zusammen mit der gesamten Kippserie auf der begleitenden DVD befindet (s.a. VII.2).

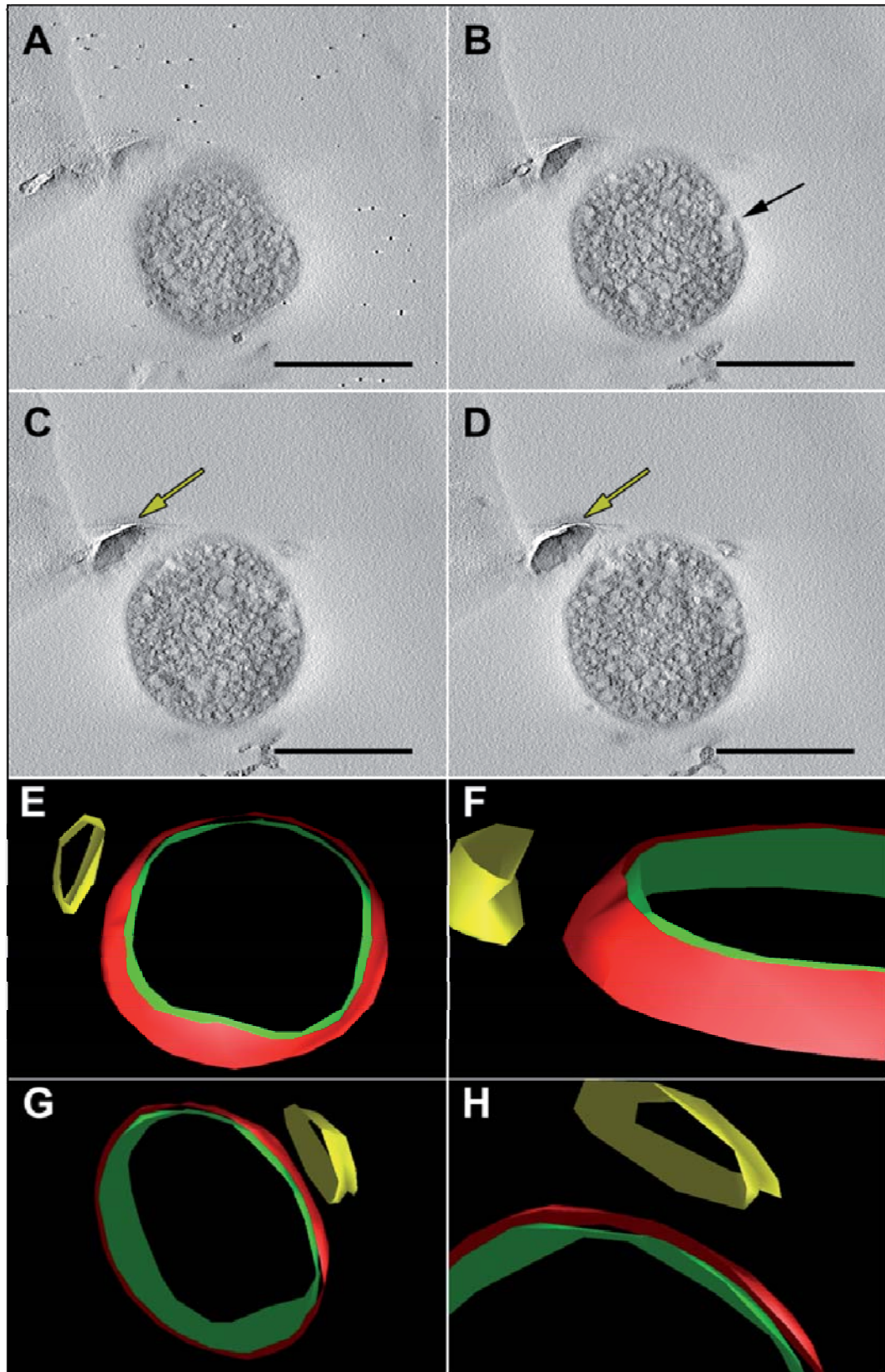


**Abbildung 40:** Auszüge einer Kippserie von *M. sedula* TH2 in Kontakt mit einem Pyritkristallit. Kippwinkel (Tilt-Serie 1): (A)  $-18.87^\circ$ , (B)  $-14.24^\circ$ , (C)  $-9.53^\circ$ , (D)  $-4.77^\circ$ , (E)  $0^\circ$ , (F)  $4.77^\circ$ , (G)  $9.53^\circ$ , (H)  $14.24^\circ$ , (I)  $18.87^\circ$ , (J)  $23.39^\circ$ , (K)  $27.77^\circ$ , (L)  $31.99^\circ$ . Negativkontrastierung. Balken: je 500 nm.

Durch die Rekonstruktion des fertigen Alignments mit IMOD erhielt man ein Tomogramm, welches aus 100 Schichten aufgebaut war. Innerhalb dieses Tomogramms wurden in jeder fünften Schicht ausgewählte Strukturen als eigenständige Objekte markiert und erlaubten es im Folgenden, daraus ein Modell der Zelle zu erstellen. Im vorliegenden Beispiel wurden die Cytoplasmamembran (grün), der S-Layer (rot) sowie der Pyrit-Kristallit (gelb) farblich

---

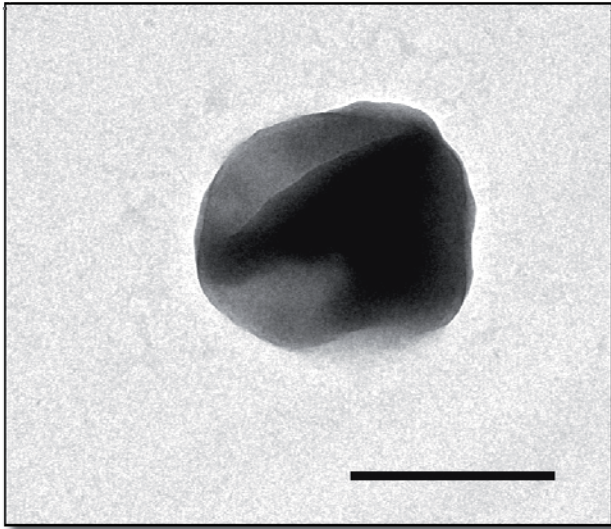
markiert (Abbildung 41). Es stellte sich heraus, dass sich der S-Layer zwar in unmittelbarer Nähe zum Pyritkristall befand, jedoch konnte eine direkte Beteiligung des S-Layers an der Adhäsion aufgrund des relativ großen Abstands zum Pyrit nicht eindeutig geklärt werden. Der entscheidende und diesbezüglich aussagekräftige Bereich lag außerhalb des untersuchten Semidünnschnittes. Im Gegensatz zu den Beobachtungen an dem Isolat SP5/1 kommt es bei *M. sedula* zu keiner Aufweitung des Pseudoperiplasmas im Bereich der Kontaktstelle. Die vesikuläre Struktur in Schicht 80 des Tomogramms (Abbildung 41 B, schwarzer Pfeil) wurde in das Modell nicht mit einbezogen, da die Abgrenzung zu den umliegenden Bereichen nicht ausreichend genau bestimmt werden konnte und daher eine Markierung des Objekts in IMOD schwierig bis unmöglich gewesen wäre. Eine Videosequenz, welche mit dem Programm aus dem Modell, sowie aus dem Tomogramm von *M. sedula* erstellt wurde, findet sich auf der Begleit-DVD (VII.2).



**Abbildung 41:** Tomographie von *M. sedula* TH2. Ausgewählte Schichten des Tomogramms (insgesamt 100). (A) Schicht 57, (B) Schicht 80, (C) Schicht 90, (D) Schicht 100. Gelbe Pfeile: Pyrit; schwarzer Pfeil: Vesikel. Balken: je 500 nm. (E-H): unterschiedliche Perspektiven des Modells, generiert aus dem vorliegenden Tomogramm. Dargestellt sind die **Cytoplasmamembran**, der **S-Layer** und **Pyrit**; Markierung der Strukturen in jeder fünften Schicht.

### 3.5 Adhäsion von Vertretern der Sulfolobales an diverse Oberflächen

Die Adhäsion von Vertretern der Ordnung der Sulfolobales an unterschiedliche organische und anorganische Oberflächen wurde bereits in früheren Arbeiten beschrieben. Zusammen mit ergänzenden Experimenten zur Adhäsion von *M. sedula* TH2 und *S. metallicus* Kra23 wurden diese Erkenntnisse erweitert und im Folgenden zusammengefasst.

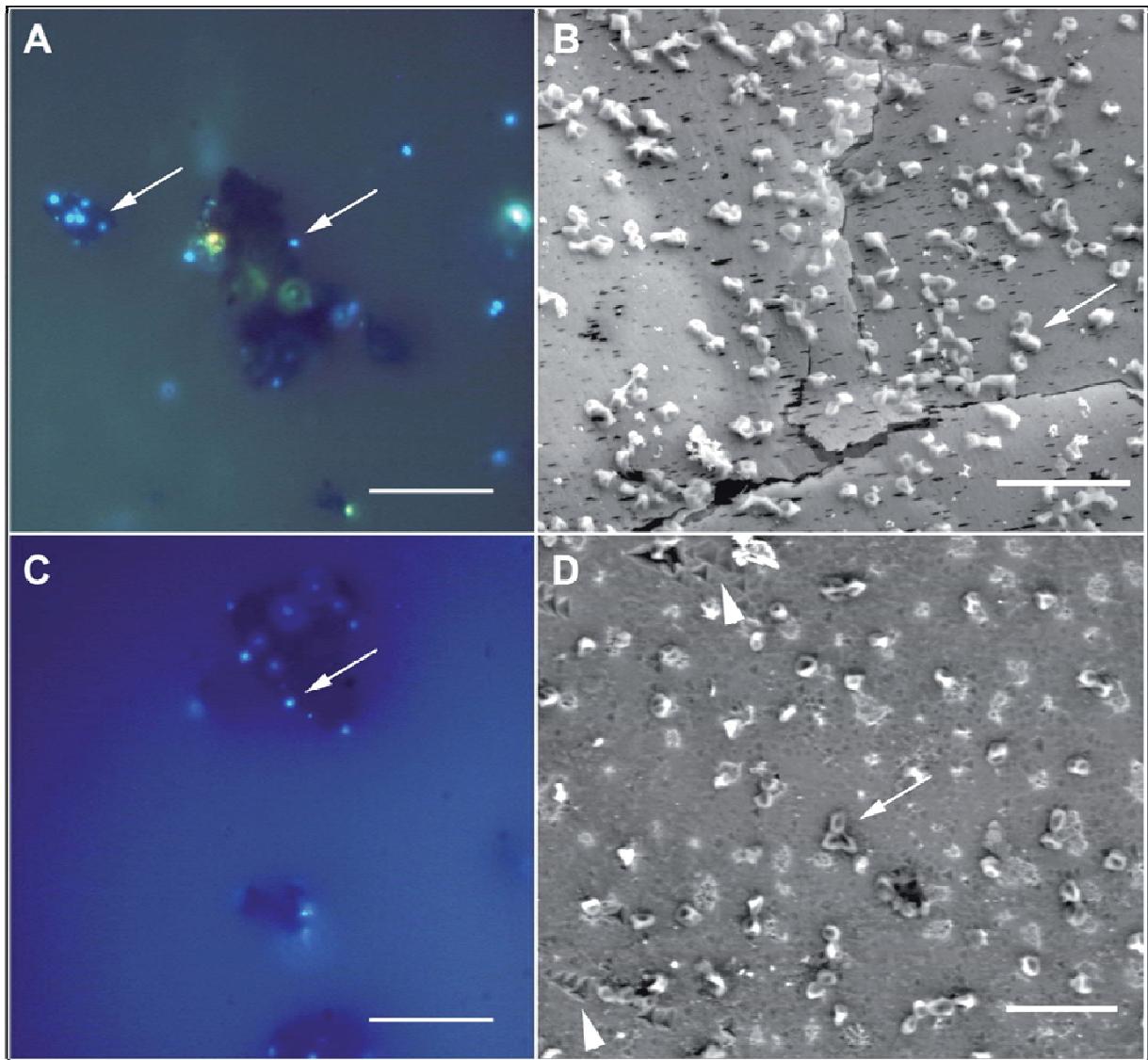


**Abbildung 42:** Adhäsion von *M. sedula* TH2 auf Kohle-befilmten Goldgrid. Die Inkubation erfolgte unter Standardbedingungen auf Knallgas (II.4.2). Negativkontrastierung mit UAc. Balken: 500nm.

Sowohl *M. sedula* als auch *S. metallicus* waren zu einer Anheftung an Kohle-befilmte Goldgrids fähig, wobei die elektronenmikroskopische Darstellung hier am Beispiel von *M. sedula* erfolgte (Abbildung 42). Desweiteren waren beide Spezies in der Lage, auf der Oberfläche von Pyrit zu wachsen, wengleich auch der Anteil adhärenter Zellen mit 60 % bzw. 50 % geringfügig voneinander abwich (Abbildung 43 A bzw. C). Die Zellen waren dabei gleichmäßig auf die Kristalloberflächen der unterschiedlichen Orientierungen {100}, {111} und {210} verteilt, d.h. es

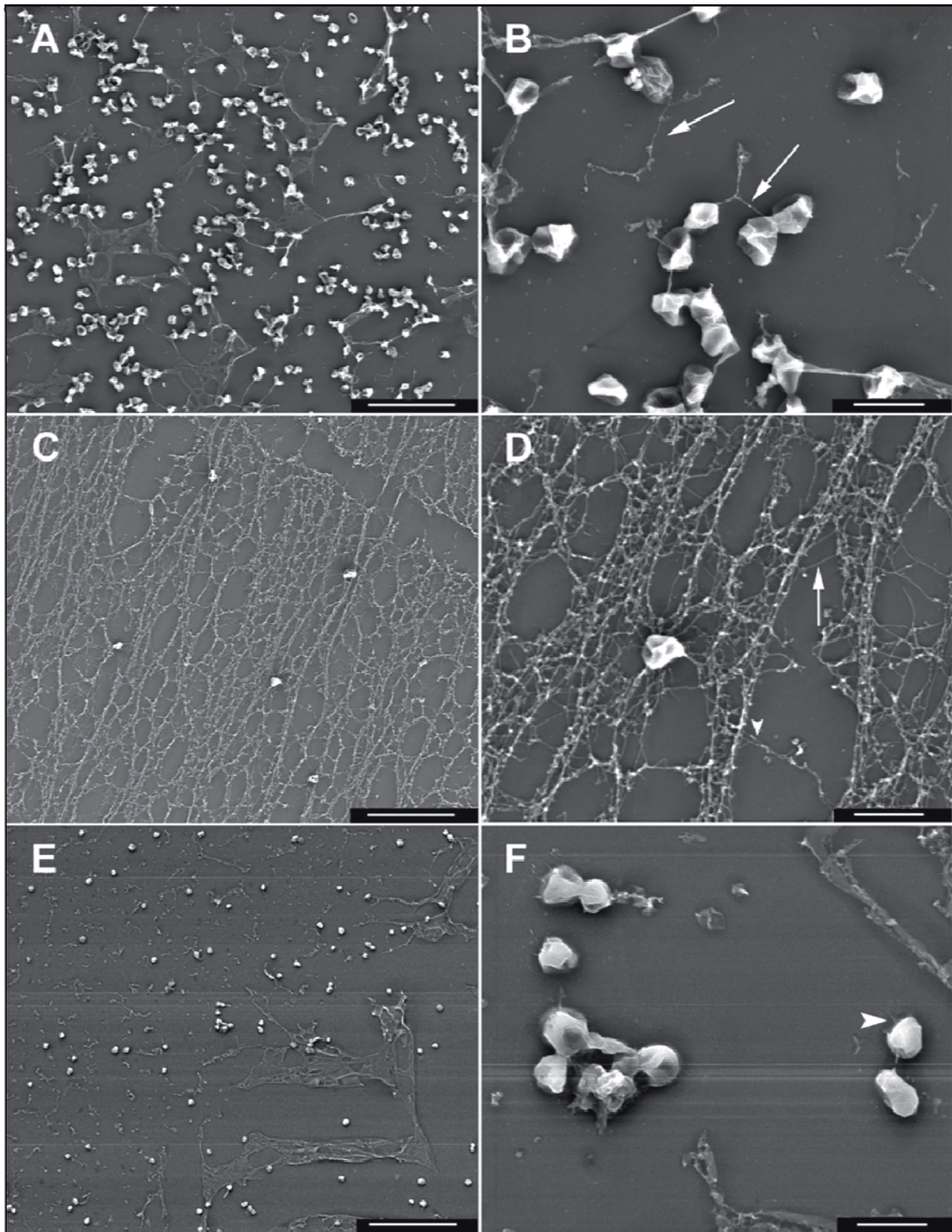
gab keine Präferenz einer bestimmten Oberflächensymmetrie. Charakteristisch waren lediglich die unter dem Einfluss der mikrobiellen Pyritoxidation verstärkt auftretenden Ätzstrukturen. Aufgrund der Raumgruppe  $Pa\bar{3}$ , die den wachsenden Pyritkristallen zugrundeliegt, besitzen kubische {111}-Fläche eine dreizählige Achse senkrecht zur Oberfläche. Diese spiegelt sich in den Ätzgruben in Form inverser, dreizähliger Pyramiden wieder (s.a. Abbildung 43 D, weiße Pfeilspitzen). Weder die Ausbildung von Zellanhängen in Form von Flagellen bzw. Pili noch ein EPS, vergleichbar den *Acidithiobacillus*-Stämmen, konnten bei *M. sedula* und *S. metallicus* auf Pyrit und auf Kohle-befilmten Goldgrids beobachtet werden.

In Adhäsionsversuchen von *M. sedula* und *S. metallicus* an Glas, Glimmer, Kunststoff und Holz konnte keine Anheftung der Zellen an diese Materialien gezeigt werden. Diesen Resultaten standen Beobachtungen gegenüber, wie sie für *S. solfataricus* Stämme P2 und PBL2025 in Zusammenarbeit mit Behnam Zolghadr (Molekularbiologie von Archaeen, MPI für terrestrische Mikrobiologie, Marburg) gemacht werden konnten. Beide Stämme waren in der Lage, auf Glas und Glimmer zu wachsen. Bei der Adhäsion von P2 auf Glas bildet dieser jedoch, im Gegensatz zum Stamm PBL2025, dünne Zellanhänge aus (weiße Pfeile; Abbildung 44 A, B). Die Zelldichte des Stammes P2 auf Glas war dabei deutlich höher als auf Glimmer. Allerdings wurden auf der sehr glatten, frisch gespaltenen Oberfläche dieses



**Abbildung 43:** Adhäsion von *M. sedula* TH2 (A, B) und *S. metallicus* Kra23 (C, D) an Pyrit. Die Organismen wurden unter Standardbedingungen (II.4.2) für 4 Tage inkubiert. (a) und (c): Fluoreszenz-mikroskopische Aufnahme DAPI-gefärbter Zellen (weiße Pfeile), entsprechend II.5.1.3. (B) und (D): Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme von Zellen auf Pyritkristallen (weiße Pfeile), deren Oberfläche der kristallographischen Orientierung {111} entspricht, teilweise mit den für diese Oberfläche typischen Ätzstrukturen in Form inverser Pyramiden (weiße Pfeilspitzen). Präparation nach II.5.3.1. Balken: 5  $\mu\text{m}$  (B, D), 10  $\mu\text{m}$  (A, C).

Alumoschichtsilikats ein dichtes Netzwerk aus Zellanhängen gebildet, welches einzelne Zellen miteinander zu verbinden schien (Abbildung 44 C, D). Hierbei konnte eindeutig zwischen Pili (Durchmesser: 6 nm; weiße Pfeilspitzen) und Flagellen (weiße Pfeile) mit einem Durchmesser von 10 bis 12 nm unterschieden werden. Adhärente PBL2025-Zellen auf Glimmer zeigten lediglich kurze Pili (weiße Pfeilspitzen; Abbildung 44 E, F). Zusätzlich bildete dieser Stamm auf dieser Oberfläche EPS (Abbildung 44 E).



**Abbildung 44:** Adhäsion der *S. solfataricus* Stämme P2 und PBL2025 auf Glas und Glimmer. (A) P2, gewachsen auf Glas. (B) Bei höherer Vergrößerung sind Zellanhänge (weiße Pfeile) zu erkennen. (C) P2 auf Glimmer. Im Gegensatz zu Glas bilden die Zellen hier ein Netzwerk aus Flagellen (weiße Pfeile) und Pili (weiße Pfeilspitzen) aus (D, vergrößerte Darstellung von Abbildung (C)). (E) Der Stamm PBL2025 bildet auf Glimmer eine EPS ähnliche Substanz aus. (F) Bei höherer Vergrößerung sind zusätzlich Pili-ähnliche Strukturen zu sehen (weiße Pfeilspitze). Die Inkubation erfolgte jeweils unter Standardbedingungen (II.4.2) für 2 Tage. Präparation entsprechend II.5.3.2. Balken: 20 µm (A), 10 µm (C, E) und 2 µm (B, D, F).

Diese Substanz schien insbesondere für diesen Stamm charakteristisch zu sein, da sie zahlreiche Zellen auch bei einer Adhäsion auf Kohle-beschichteten Goldgrids umgab. Auf letzteren bildeten sowohl PBL2025 als auch P2 unterschiedlich dicke Zellanhänge in Form von Flagellen und Pili (s.a. Abschnitt VII.4, Abbildung 47). Obwohl *S. solfataricus* P2 nicht in der Lage ist, Pyrit zu oxidieren, wurde Wachstum auf dieser Oberfläche nachgewiesen. Abweichend von Zolghadr *et al.* (2010) konnte bei einer Wiederholung der Experimente auch für PBL2025 eine Interaktion mit Pyrit dokumentiert werden, der Stamm zeigte dabei ebenso wie P2 keinerlei Zellanhänge.

Mit Hilfe des Stammes *S. solfataricus* PBL2025 war es zudem möglich, mit den Stämmen  $\Delta$ flaJ und  $\Delta$ upsE Mutanten zu erzeugen. Bei  $\Delta$ flaJ handelte es sich um eine unflagellierte Mutante, die keine Motilität auf Gelrite-Platten zeigte. Die Deletion der zentralen ATPase UpsE, welche in die Assemblierung der Pili involviert ist, blieb auch für *S. solfataricus*  $\Delta$ upsE nicht ohne Folgen. Durch die fehlenden Pili war der Stamm außer Stande, nach UV-Behandlung zu aggregieren. In beiden Stämmen führt die Unfähigkeit zur Ausbildung von Flagellen bzw. Pili dazu, dass sie nicht mehr auf Glas, Glimmer und Pyrit adhären konnten. Lediglich auf Kohle-befilmten Goldgrids wurden einige wenige Zellen gefunden. Vermutlich handelte es sich dabei jedoch um Präparationsartefakte, hervorgerufen durch die Dehydratisierung der Proben für die Elektronenmikroskopie.

Eine Zusammenfassung des Adhäsionsverhaltens der untersuchten *Sulfolobus*-Stämme findet sich in der folgenden Tabelle 29.

Oberfläche	<i>M. sedula</i>	<i>S. metallicus</i>	<i>S. solfataricus</i>			
	TH2	Kra23	P2	PBL2025	$\Delta$ flaJ	$\Delta$ upsE
Pyrit	++	++	+	+	-	-
Glimmer	-	-	++ <sup>a,b</sup>	++ <sup>a,c</sup>	-	-
Glas	-	-	++ <sup>a,b</sup>	++	-	-
Gold-Grids	+	+	++ <sup>a,b</sup>	++ <sup>a,b,c</sup>	(-)	(-)
Kunststoff	-	-	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Holz	-	-	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.

**Tabelle 29:** Übersicht zu den Aufwuchsversuchen von Vertretern der Sulfolobales auf unterschiedlichen Oberflächen. ++, sehr hohe Zelldichte; +, Wachstum auf Oberfläche; -, kein Wachstum; n.d., nicht getestet; <sup>a</sup>, Ausbildung von Pili; <sup>b</sup>, Flagellen; <sup>c</sup>, EPS.

## IV Diskussion

### 1 Die phylogenetische Einordnung der *Acidithiobacillus*-Stämme SP5/1 und HV2/2

#### 1.1 Gemeinsamkeiten und Unterschiede zu bereits beschriebenen *Acidithiobacillus*-Spezies

Wie die Sequenzanalysen der 16S rRNA Gene ergaben, steht das Isolat SP5/1 dem Typstamm *A. ferrooxidans* DSM 14882<sup>T</sup> nahe. Das zweite untersuchte Isolat HV2/2, zeigte Ähnlichkeiten mit dem *A. caldus* Stamm TC1 (Edwards et al., 2000). Hinsichtlich des Typstammes *A. caldus* DSM 8584<sup>T</sup> (Hallberg und Lindström, 1994) wiesen die Sequenz des 16S rRNA Gens einen Austausch von 13 Basen auf, was einem Unterschied von 1 % entsprach. Da diese Ergebnisse lediglich einen Hinweis auf die phylogenetische Zugehörigkeit erlaubten, jedoch für eine Einordnung eines Stammes bzw. einer Spezies nicht ausreichten, waren für eine gültige Beschreibung umfangreiche physiologische und morphologische Untersuchungen an den Stämmen SP5/1 und HV2/2 erforderlich. Diese wiesen zahlreiche Gemeinsamkeiten mit bereits beschriebenen Vertretern der Gattung *Acidithiobacillus* auf. Mit Zelldurchmessern zwischen 0.5 und 0.7 µm sowie einer Länge von 1 bis 2.5 µm liegen sie in den Bereichen, wie sie auch für *A. ferrooxidans*, *A. thiooxidans*, *A. caldus* und *A. ferrivorans* beschrieben wurden (Hallberg et al., 2010). Beide Stämme verfügten über Pili und eine polare Flagelle und waren im Gegensatz zu *A. ferrooxidans* DSM 14882<sup>T</sup> (Hallberg et al., 2010) aktiv beweglich. Sie besaßen den typischen S-Layer mit p2-Symmetrie, der auch bei *A. ferrooxidans* DSM 14882<sup>T</sup> und *A. thiooxidans* DSM 14887<sup>T</sup> auftritt. Wie für Vertreter der *Acidithiobacillus* üblich, waren sie zur Oxidation von Schwefel und reduzierten Schwefelverbindungen ebenso wie zum Wachstum bei hohen Schwermetallkonzentrationen fähig (Rawlings, 2005; Valdés et al., 2009). Wie *A. ferrooxidans* DSM 14882<sup>T</sup> war es dem Stamm SP5/1 möglich, auf FeSO<sub>4</sub>, Sulfidmineralen, Wasserstoff und anaerob auf Fe<sup>3+</sup> zu wachsen, nicht aber, wie für den Typstamm beschrieben, auf Tetrathionat. Zusätzlich war ein Wachstum auf Stickstoff-freiem Medium durch die Fixierung atmosphärischen Stickstoffs möglich. Die beschriebenen Eigenschaften ließen, ebenso wie der S-Layer, keine eindeutige Abgrenzung vom Typstamm *A. ferrooxidans* DSM 14882<sup>T</sup> zu. Deshalb wird für das Isolat SP5/1, welches bisher unter der Bezeichnung „*Thiobacillus sphaeroides*“ geführt wurde (Huber, 1987), eine Neuzuweisung zur Spezies *A. ferrooxidans* vorgeschlagen (Abschnitt V.1). Die Hinterlegung des Stammes erfolgte bei der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ) unter der Nummer DSM 24419.

Die Möglichkeit zur Stickstofffixierung ist ein Kriterium, das die Spezies *A. ferrooxidans* sowohl vom Stamm HV2/2 als auch von *A. caldus* DSM 8584<sup>T</sup> unterschied. Trotz der zahlreichen physiologischen und morphologischen Gemeinsamkeiten und der Sequenzübereinstimmungen von drei Proteinen besaß das neue Isolat HV2/2 eine charakteristische Eigenschaft, welche es zweifelsohne vom Typstamm DSM 8584<sup>T</sup> abgrenzte (Hallberg und Lindström, 1994): Die Fähigkeit zur Oxidation von Pyrit und Eisensulfat. Für diesen Stoffwechselweg fehlt *A. caldus*, so die bisherigen Erkenntnisse, Rusticyanin (RusA) oder wie in *A. ferrivorans* RusB (Hallberg *et al.*, 2010) bzw. ein dazu vergleichbares Protein (Valdés *et al.*, 2009). Für HV2/2 wurde erst kürzlich ein Protein mit 16 kDa isoliert, welches aufgrund entsprechender Masse als Homolog zu Rusticyanin in Frage käme, allerdings blieben Versuche einer Sequenzierung bislang erfolglos. Dass eine Oxidation von Fe<sup>2+</sup> auch ohne Rusticyanin möglich ist, konnte an dem bislang nicht näher bestimmten Bakterienstamm TI-1 durch die Isolierung einer neuartigen Oxidase gezeigt werden (Takai *et al.*, 2001). Zusätzlich zu einem Rusticyaninhomolog würde auch eine Komplexierung von Fe<sup>3+</sup> innerhalb des für HV2/2 gezeigten S-Layers einen chemischen Abbau von Pyrit, entsprechend dem Stamm SP5/1, ermöglichen und den Organismen den Zugang zum sulfidischen Anteil des Erzes erleichtern. Auf diese Weise ließe sich allerdings nur die Oxidation von Pyrit, nicht aber die von FeSO<sub>4</sub> erklären. Durch die vollständige Oxidation des Schwefels steht lediglich Fe<sup>2+</sup> als Elektronendonator zur Verfügung. Analysen diverser Isolate von *A. ferrooxidans* und *A. ferrivorans* haben bereits gezeigt, dass es vermutlich mehr als nur einen möglichen Eisenoxidationsweg gibt (Amouric *et al.*, 2011).

Für *A. caldus* TC1 wurde ebenfalls ein Wachstum auf Pyrit gezeigt, wobei hier die Nutzung des Sulfidanteils zur Energiegewinnung angenommen wurde (Edwards *et al.*, 2000; Semenza *et al.*, 2002; Zhou *et al.*, 2007). Die Zellen des Stammes TC1 zeigten dabei eine vermehrte Adhäsion an die Pyritoberfläche, wobei vermutet wurde, dass dies durch eine Anhäufung von verstoffwechselbaren Schwefelverbindungen an der Oberfläche verursacht wird. Der Nachweis eines S-Layers, von Pili oder eines zu Rusticyanin homologen Proteins könnte zur Klärung der Verwandtschaftsverhältnisse zwischen den Stämmen TC1 und HV2/2 beitragen. Die Fähigkeit zum Wachstum auf Pyrit und FeSO<sub>4</sub> erfordert, verglichen mit der fehlenden Verstoffwechslung von Tetrathionat durch SP5/1, einen derart hohe physiologische Anpassung der Organismen, dass dies als maßgebendes Kriterium angesehen wird, den Stamm HV2/2 als Vertreter einer eigenständigen Spezies *Acidithiobacillus striatothermus* innerhalb des Genus *Acidithiobacillus* einzuordnen. Ein Vorschlag für die Beschreibung dieser neuen Spezies erfolgt in Abschnitt V.2. Für eine gültige Beschreibung wurde eine Kultur des Stammes *A. striatothermus* HV2/2 bei der DSMZ unter DSM 24413 hinterlegt.

## 2 Der S-Layer von *Acidithiobacillus*: Mehr als nur ein regelmäßiges Oberflächenprotein

Schon im Vorfeld dieser Arbeit war bekannt, dass die Gram-negativen  $\gamma$ -Proteobakterienstämme SP5/1 und HV2/2 einen regelmäßigen S-Layer mit p2-Symmetrie besitzen (Klingl, 2007). Zugleich handelte es sich um die erste Beschreibung einer derartigen Zellwandstruktur innerhalb der Gattung *Acidithiobacillus* in Verbindung mit dem Nachweis der Glykosylierung des Proteins. Als Erklärung für die bislang erfolglose Blast-Suche im Hinblick auf Slp90 kann gemutmaßt werden, dass das unprozessierte Protein, welches Afe\_2303 entspräche, durch die saure Umgebung im Medium (pH 2.5) stabilisiert wird. Eine Präparation des Proteins mit MES-Puffer bei pH 6.0 könnte diese daher destabilisieren. Nebenbei ist eine hydrolytische Spaltung des Proteins nicht auszuschließen. Jedoch wären in diesem Fall unterschiedliche Resultate, die N-terminale Sequenzierung nach Edman betreffend, zu erwarten gewesen. Eine proteolytische Spaltung des Proteins wäre aus zweierlei Sicht denkbar. So besteht die Möglichkeit, dass der S-Layer mit einer Protease assoziiert ist, die zu einem partiellen Abbau des Proteins führt. Beispiele für Interaktionen eines S-Layers mit Enzymen stellen die STABLE- Protease in *S. marinus* (Peters *et al.*, 1995; 1995) sowie eine extrazelluläre  $\alpha$ -Amylase, gebunden an den S-Layer von *B. stearothermophilus* DSM 2358, dar (Egelseer *et al.*, 1995).

Bei einer Lagerung von Proteinen bei neutralem pH-Wert kann zudem eine Aggregation der Monomere eintreten. Infolgedessen können Serin-Reste an der Oberfläche der Aggregate eine nachweisbare Protease-Aktivität entwickeln (Sharma und Luthra-Guptasarma, 2009). Diese Aktivität kann, im Gegensatz zu der einer Serin-Protease, üblicherweise nicht durch PMSF gehemmt werden.

Die bedingte Übereinstimmung von Slp90 mit Afe\_2303 deutet auf einen geringen Konservierungsgrad der Sequenz bei eng verwandten Spezies hin, ähnlich wie bei der großen S-Layer-Untereinheit bei den Sulfolobales (Veith *et al.*, 2009). Dies würde darüber hinaus auch erklären, weshalb die Versuche einer Amplifikation der S-Layer-Gene *slp* und *afe\_2303* aus genomischer DNA der Stämme HV2/2 und SP5/1 bislang zu keinem Ergebnis führten. Für *B. stearothermophilus* PV72 ist bekannt, dass, abhängig von den Inkubationsbedingungen, zwei unterschiedliche S-Layer Proteine SbsA und SbsB exprimiert werden (Scholz *et al.*, 2001). Obwohl im selben Organismus codiert, weisen die Gene beider Proteine keine signifikanten Sequenzähnlichkeiten auf. Darüber hinaus kann auch eine fehlerhafte Genomsequenz bzw. falsche Annotation der *A. ferrooxidans* Gene, vergleichbar dem Fla-Operon in *P. furiosus*, ursächlich für eine Problematik bezüglich der Zuordnung der N-terminalen Proteinsequenz zu annotierten Proteinen sein (Näther, 2007).

Innerhalb der Archaeen, sowie bei Gram-positiven Bakterien wie *Thermoanaerobacter thermohydrosulfuricus* (Bock *et al.*, 1994; Beveridge *et al.*, 1997), sind glykosylierte S-Layer bereits mehrfach nachgewiesen (Messner und Schäffer, 2000; Eichler, 2003; Messner, 2004). Für Gram-negative Bakterien fehlte, mit Ausnahme von *Tannerella forsythia* (Lee *et al.*, 2006), bislang ein eindeutiger Beweis (Schäffer und Messner, 2001; Ristl *et al.*, 2011). Studien an *Parabacteroides distasonis* (Fletcher *et al.*, 2007) und den hier beschriebenen *Acidithiobacillus*-Stämmen lassen aber vermuten, dass glykosylierte S-Layer bei Gram-negativen Bakterien deutlich weiter verbreitet sind, als bisher angenommen.

Bei *Acidithiobacillus* zeigten sich Ähnlichkeiten in der Ultrastruktur des Oberflächenproteins mit dem S-Layer des Gram-positiven Bakteriums *Geobacillus stearothermophilus*, Stamm NRS 2004/3a (Schäffer und Messner, 2001). Auch bei diesem Organismus wurde eine p2-Symmetrie nachgewiesen, wobei sich die entsprechenden Gitterkonstanten bei *G. stearothermophilus* (11.6 nm; 9.4 nm; 78 °; Schäffer *et al.*, 2002) nur unwesentlich von den Werten unterschieden, wie man sie bei den Stämmen SP5/1 (15.6 nm; 6.3 nm; 82 °) und HV2/2 (16 nm; 6.2 nm; 81.3 °) beobachtete. Bedingt durch die spezielle p2-Symmetrie entsteht ein streifenförmiges Muster an der Zelloberfläche, wobei die einzelnen Streifen am Zellpol zusammenlaufen. Höchstwahrscheinlich werden neu synthetisierte Untereinheiten in diesem Bereich in das Proteingitter integriert (Baumeister und Lembcke, 1992; Pum *et al.*, 1991). Dies entspricht der Tatsache, dass Stäbchen-förmige Zellen in erster Linie durch eine Zunahme der Länge und nicht des Durchmessers wachsen, was durch die Ergebnisse der tomographischen Untersuchungen am *Acidithiobacillus*-Stamm SP5/1 bestätigt werden konnte. Speziell bei S-Layern mit p2-Symmetrie muss der Einbau der Untereinheiten jedoch nicht nur auf den Zellpol beschränkt sein. Bei *B. stearothermophilus* PV72 wurde durch eine radioaktive Markierung von Aminosäuren gezeigt, dass dies auf der gesamten Zelloberfläche geschehen kann (Gruber und Sleytr, 1988). Daneben erleichtern Gitterfehler eine Integration von S-Layer Monomeren und führen zu einer weiteren Destabilisierung des Proteingitters in diesem Bereich (Pum *et al.*, 1991). In Affinitätsstudien am S-Layer Protein SbsC aus *B. stearothermophilus* ATCC 12980, welches ebenfalls Proteinkristalle mit p2-Symmetrie bildet, wurde für den N-terminalen Bereich des Proteins eine Involvierung in die Erkennung eines sekundären Zellwandpolymers nachgewiesen (Jarosch *et al.*, 2000). Aus diesem Grund ist auch für den S-Layer des Isolates SP5/1 eine Interaktion mit einem Zellwandpolymer zu vermuten. Ebenso wie das mutmaßliche S-Layer Protein Afe\_2303 offenbarte auch der S-Layer in *Methanosarcina mazei* eine *beta-propeller*-Domäne am N-Terminus (Veith *et al.*, 2009). Eine Polymerisierung dieser Domäne könnte zu Aggregaten bei der Lagerung der S-Layer Präparationen führen (Sharma und Luthra-Guptasarma, 2009). Durch eine proteolytische Spaltung im Bereich der Aminosäure 390 in Afe\_2303, welche sich eben im Übergangsbereich des *beta-propellers* zum Rest des Proteins befindet, könnte der C-

terminale Bereich freigesetzt werden und zu der SIp90-Bande im SDS-Gel führen. Nicht auftrennbare Polymere in den Taschen der Gele scheinen, in anbetracht dessen ihren Ursprung in den *beta-propeller*-Aggregaten zu haben.

An der Polymerisation bzw. dem Verhindern dieser Polymere könnte in der Zelle unter anderem das Chaperonin GroEL beteiligt sein. Zum einen würde dies die Detektion dieses Proteins in S-Layer-Präparationen der Stämme SP5/1 erklären, zum anderen wird insbesondere bei acidophilen und hyperthermophilen Mikroorganismen eine Freisetzung von Chaperonin GroEL als Faltungshelfer ins Periplasma bzw. das umgebende Medium in Betracht gezogen (Frisk et al., 1998; Hennequin et al., 2001; Bergonzelli et al., 2006; Pantzar et al., 2006; Sano et al., 2010)

Eine Charakterisierung der S-Layer Proteine beider *Acidithiobacillus*-Spezies, des S-Layer defizienten Stammes  $\Delta$ SIp90 sowie einiger weiterer Proteobakterien sollten zusätzliche Erkenntnisse hinsichtlich der Funktionalität des S-Layers vermitteln und seine Rolle beim Abbau von Pyrit aufzeigen.

## 2.1 Die Symmetrie des S-Layers als phylogenetisches Merkmal

Zahlreiche Untersuchungen an S-Layern verschiedenster Organismengruppen haben gezeigt, dass die Symmetrie und Dimensionen der Oberflächenproteine oft charakteristisch für Vertreter einer Ordnung bzw. einer Gattung sind. Innerhalb der Archaeen zählen hierzu unter anderem die Thermoproteales (p6-Symmetrie) sowie die Sulfolobales. Für letztere wurden bislang ausschließlich S-Layer mit p3-Symmetrie nachgewiesen (König et al., 2007). Im Einklang mit früheren Untersuchungen an *S. acidocaldarius*, *S. solfataricus*, *S. shibatae*, *Acidianus infernus* (König et al., 2007), *A. brierleyi* (Baumeister et al., 1991) und *Metallosphaera prunae* (Fuchs et al., 1995) wird dieser Sachverhalt auch durch aktuelle Ergebnisse bezüglich der S-Layer von *M. sedula*, *S. metallicus* (Klingl, 2007) und *A. ambivalens* (Veith et al., 2009) gestützt. Neben der identischen Symmetrie zeigt sich auch bei den Gitterkonstanten eine relativ hohe Homogenität in einem Bereich zwischen 20 und 21 nm. Aufgrund dessen ist es möglich, den S-Layer in begrenztem Maße als taxonomischen Marker zu betrachten (Baumeister und Lembcke, 1992; Rachel, 1999; König et al., 2007).

Die Tatsache, dass der Nachweis eines S-Layer Proteins mit p2-Symmetrie und beinahe identischen Gitterkonstanten in zwei Vertretern der Gattung *Acidithiobacillus* möglich war (Klingl, 2007), gab Grund zu der Annahme, es könnte sich dabei ebenfalls um ein phylogenetisch charakteristisches Merkmal handeln. Unterstützt wurde diese These durch den Nachweis von S-Layern mit p2-Symmetrie in den Typstämmen *A. ferrooxidans* DSM 14882<sup>T</sup> und *A. thiooxidans* DSM 14887<sup>T</sup>. Organismen mit einer phylogenetisch größeren

Distanz zu den Stämmen HV2/2 und SP5/1 wiesen hingegen ein abweichendes Erscheinungsbild auf. Ebenfalls mit einem S-Layer bedeckt, jedoch ohne die charakteristische p2-Symmetrie, waren die Zellen von *T. azoricus* HW3. Eine äußere Membran als äußerste Zellwandkomponente hatten *T. prosperus* LM3, *T. plumbophilus* Gro7 und *T. cuprina* Hö5. Damit entsprechen sie dem bisherigen Bild eines Gram-negativen Bakteriums mit Cytoplasmamembran und äußerer Membran, wie es für *Acidithiobacillus* angenommen wurde (Jones *et al.*, 2003; Sand und Gehrke, 2006). Möglicherweise hängt jedoch die Ausbildung bestimmter Proteine einschließlich des S-Layers von Inkubationsbedingungen und entsprechenden Substraten ab. So führte die Inkubation von *A. ferrooxidans* mit den Substraten  $\text{Fe}^{2+}$ , Schwefel oder Pyrit zu einem unterschiedlich hohen Proteingehalt an der Zelloberfläche bei den beiden letztgenannten Energiequellen (Sharma *et al.*, 2003). Der Wechsel von Schwefel-Medium zu Medium mit  $\text{FeSO}_4$  führte in *A. ferrooxidans* ATCC 13661 dazu, dass die Expression eines sogenannten 92K-Proteins (92 kDa) und von Rusticyanin induziert wurde (Mjoli und Kulpa, 1988). Aufgrund der entsprechenden Masse des 92K-Proteins und der Lokalisation in der äußeren Membran ist ein Zusammenhang mit dem hier beschriebenen S-Layer von *Acidithiobacillus* nicht auszuschließen. Allerdings geht man beim 92K-Protein davon aus, dass es sich um ein Porin-Trimer (3 x 32 kDa) handelt, welches für den Transport von  $\text{Fe}^{2+}$  und  $\text{Fe}^{3+}$  durch die äußere Membran verantwortlich ist (Rawlings, 2001). Obwohl der fehlende S-Layer in den *Thiobacillus*- und *Thiomonas*-Stämmen also auch auf die Inkubationsbedingungen zurückzuführen sein könnte, beschränkten sich die Beobachtungen des typischen streifenförmigen S-Layers ausschließlich auf die Gattung *Acidithiobacillus*. Aus diesem Grund scheint er sich bedingt als taxonomischer Marker für die Zuordnung eines Organismus zur gleichen Spezies oder sogar zur gleichen Gattung zu eignen. Zur genaueren Charakterisierung bedarf es jedoch noch weiterer Markermoleküle wie EF-Tu, den großen ATPase Untereinheiten oder den kompletten Genomen der Organismen (Ludwig *et al.*, 1998; Wolf *et al.*, 2002; Wu *et al.*, 2009). Ob man das Merkmal ‚S-Layer mit p2-Symmetrie‘ sogar, entsprechend den Sulfolobales und Thermoproteales, auf die Ebene der Ordnung oder Familie ausweiten kann, ist bisweilen noch unklar.

## 2.2 Einfluss des S-Layers auf Adhäsion, Zellform und $\text{Fe}^{3+}$ -Komplexierung

Aufgrund zahlreicher Beobachtungen im Rahmen vergleichender Experimente zwischen den Stämmen SP5/1 und  $\Delta\text{Slp90}$  konnten Rückschlüsse auf mögliche Funktionen des S-Layers gezogen werden. Die Ursache für die Abwesenheit des S-Layers bei der Labormutante  $\Delta\text{Slp90}$  ist bislang noch unbekannt, könnte jedoch mehrere Gründe haben. Sogenannte Insertionssequenzen können auf S-Layer Gene sowohl als Aktivator wie auch als Repressor

wirken (Sára und Sleytr, 2000). Zusätzlich vermag auch eine Lokalisation des Gens auf einem Plasmid die Transkription des S-Layer Gens zu verhindern, sollte das Plasmid durch wiederholte Inkubation verloren gegangen sein. Ausschlaggebend für diese Theorie ist natürlich die Tatsache, dass jenem Plasmid keine entscheidende Rolle für die Lebensfähigkeit der Organismen zukommt. Gleichzeitig würde dies eine Erklärung dafür liefern, dass S-Layer innerhalb der Gattung *Acidithiobacillus* bisher weder beschrieben noch beobachtet wurden.

Weitestgehend auszuschließen ist ein Einfluss des S-Layers auf die Adhäsion an Pyrit. Es konnte kein signifikanter Rückgang an adhärennten Zellen beim Stamm  $\Delta$ Slp90 nachgewiesen werden, welchen man auf das fehlende Oberflächenprotein hätte zurückführen können. Als viel wichtiger für die Adhäsion werden, die für den Stamm SP5/1 nachgewiesen, Zellanhänge (Flagellen und Pili) und extrazellulären polymeren Substanzen (EPS) eingeschätzt (Gehrke *et al.*, 1998; Harneit *et al.*, 2005; Jonson *et al.*, 2005; Sand *et al.*, 2006; Zolghadr *et al.*, 2010). Letzteres formt dabei eine Art Kapsel oder Schleimschicht mit der die Zellen an der Oberfläche festkleben, was zugleich der erste Schritt zur Ausbildung eines Biofilmes ist (Harneit *et al.*, 2006; Schopf *et al.*, 2008). Bezüglich der Pili konnte bei *A. ferrooxidans* eine Korrelation zwischen deren Expression und einer starken Anheftung der Zellen an Pyrit festgestellt werden (Li *et al.*, 2010). Bakterien ohne Pili zeigten hingegen nur eine geringe Tendenz zur Adhäsion an Mineraloberflächen. Vergleichbare Resultate lieferten Experimente mit Flagellen- und Pili-Mutanten von *S. solfataricus* PBL2025 (Zolghadr *et al.*, 2010). Ohne die Zellanhänge verlieren die Organismen weitestgehend ihre Fähigkeit, an Oberflächen zu adhären.

Hinsichtlich ihrer Morphologie weisen die Zellen der Labormutante  $\Delta$ Slp90 einen beinahe kokkoide Zellform auf, eine Beobachtung, die bereits in früheren Untersuchungen am Stamm SP5/1 bei wiederholten Überimpfungen beschrieben wurde (Huber, 1987).

Hinsichtlich ihres Einfluss auf die Zellform sind diverse zelluläre Strukturen wie Membranen, Murein oder Oberflächenproteine untersucht worden (Henning, 1975). Unter diesem Aspekt erscheinen einige Beobachtungen an S-Layern und vergleichbaren Proteinen bestimmter Organismen besonders interessant. Sowohl der T-Layer von *Bacillus brevis* (Henry, 1972) als auch der Proteinlayer von *Halobacterium halobium* (Mohr und Larsen, 1963) scheinen einen Einfluss auf die Stäbchenform der Zellen zu haben. Für eine klare Aussage muss jedoch ausgeschlossen werden, dass es sich dabei lediglich um einen sekundären Effekt handelt und der S-Layer nicht einfach nur einen Bindungspartner des tatsächlich formgebenden Proteins darstellt (Henning, 1975). Zahlreiche Studien lieferten nach und nach ein detailliertes Bild über die Proteine und Prozesse, die der Ausbildung stäbchenförmiger

Zellen zugrundeliegen. Die Rigidität und Form des Mureinsacculus, einem Makromolekül, welches in Gram-positiven Bakterien einen Hauptbestandteil der Zellwand bildet, determiniert in hohem Maße die Zellform (Osborn und Rothfield, 2007). Zusammen mit dem bakteriellen Aktin homolog MreB formt das integrale Membranprotein RodZ in *Escherichia coli* an der Cytoplasmamembran spiralförmige Filamente in Längsrichtung der Zelle und ist somit an der Aufrechterhaltung des zylindrischen Teils der Zelle zwischen den Polkappen beteiligt (Shiomi *et al.*, 2008, 2009). MreB und dessen Homolog Mbl in *Bacillus subtilis* (Daniel und Errington, 2003) stellen essentielle Komponenten des Cytoskeletts dar und sind darüber hinaus an der Neusynthese von Peptidoglykan (Murein), beim Längenwachstum und der Zellteilung beteiligt (Osborn und Rothfield, 2007). Gram-negative Bakterien besitzen, verglichen mit Gram-positiven, weitaus weniger Peptidoglykan. Folglich ist bei ihnen der Einfluss des Cytoskeletts auf die Zellform deutlich stärker zu gewichten, als der des Mureinsacculus (Margolin, 2009).

Folglich lässt sich schließen, dass dem S-Layer zwar keine Zellform-bestimmende, jedoch eine Zellform-erhaltende Funktion zugeschrieben werden kann, wie es bei den Crenarchaeen für Vertreter der Thermoproteales gezeigt wurde (Messner *et al.*, 1986; Wildhaber und Baumeister, 1987). Fraglich bleibt, ob die Bindungskräfte zwischen den S-Layer-Untereinheiten und zwischen S-Layer und Zellwandkomponenten stark genug sind, um dem Zellturgor entgegen wirken zu können (Engelhardt, 2007a; 2007b).

Messungen der physiologischen Aktivität des Stammes SP5/1 und der Labormutante, welche die Bestimmung der Konzentration von  $\text{Fe}^{3+}$ -Ionen einschloss, führten zu der Frage, ob der S-Layer zu einer Komplexierung von  $\text{Fe}^{3+}$  in der Lage ist. Hier ging man bislang davon aus, dass dafür ebenfalls das bereits erwähnte EPS verantwortlich ist (Sand und Gehrke, 2006). Darin komplexierte Eisenionen würden entsprechend der allgemeinen Annahme für einen direkten Angriff des Pyritgitters in Form eines Kontakt-Mechanismus entsprechend der Gleichung [4] (Abschnitt I.2) zur Verfügung stehen. Beobachtungen im Rahmen der vorliegenden Arbeit schreiben diese Rolle jedoch eher dem S-Layer zu. Maßgeblich für diese Annahme sind Untersuchungen am S-Layer von *B. sphaericus* JG-A12, für den an Ultradünnschnitten die Bindung von Uranylsalzen nachgewiesen werden konnte (vgl. Abbildung 3; Merroun *et al.*, 2005; Pollmann *et al.*, 2006). Abgesehen von S-Layern besitzen noch weitere Biomoleküle die Fähigkeit,  $\text{Fe}^{3+}$  zu binden oder zu chelatieren, wie zum Beispiel organisches Material, welches als „*natural organic matter*“ bezeichnet wird, Carboxyl- Amino- und Sulfhydrylgruppen (Shears *et al.*, 1987; Rose und Waite, 2003), Siderophore oder Ferritin (Witter *et al.*, 2000) und Enterobactin, welches die bisher höchste beobachtete Affinität zur Bildung von Chelat-Komplexen mit Eisen besitzt (Hofte, 1993). Insbesondere der Effekt von Carboxylgruppen erscheint im Hinblick auf den S-Layer Slp90

bzw. Afe\_2303 interessant. Immerhin weisen bei letzterem 10.5 % der Aminosäuren einen Carboxylrest auf (Aspartat oder Glutamat) und würden so unweigerlich die Kapazität des Proteins zur Komplexierung von  $\text{Fe}^{3+}$  erhöhen. Dieses Protein würde sich zudem optimal in das bisher angenommene Schema des Pyritabbaus einfügen (Valdés *et al.*, 2008). Im Bereich der Kontaktstelle zwischen dem S-Layer und der Pyritoberfläche würde sich in diesem Bereich eine Mikroumgebung mit einem lokal veränderten Redoxpotential bilden. Wie bereits durch Sand und Kollegen für das EPS angenommen, würde so die Reaktivität beteiligter Enzyme erhöht und die Energieausbeute aus der Pyritoxidation gesteigert (Sand und Gehrke, 2006; Mielke *et al.*, 2003; Bergel, 2007). Die gebundenen  $\text{Fe}^{3+}$ -Ionen greifen Pyrit in einem abiotischen Mechanismus an und setzen  $\text{Fe}^{2+}$  und Thiosulfat frei (Schippers und Sand, 1999; Rohwerder *et al.*, 2003; Valdés *et al.*, 2008; Gleichung [4], Abschnitt I.2). Letzteres kann durch eine nachgewiesene Tetrathionathydrolase zu Tetrathionat umgesetzt werden (Rzhepishchevska *et al.*, 2007; Valdés *et al.*, 2008). Im Gegensatz zu der Identifikation des Enzyms im Rahmen dieser Arbeit konnte es bisher ausschließlich aus Zellen isoliert werden, welchen Tetrathionat, nicht aber Pyrit als Substrat zugesetzt worden war (Kanao *et al.*, 2007). Cytochrom c2 oxidiert die  $\text{Fe}^{2+}$ -Ionen, regeneriert damit die für den abiotischen Angriff benötigten  $\text{Fe}^{3+}$ -Ionen und überträgt die energiereichen Elektronen aus dem Oxidationsprozess auf Rusticyanin. Die Elektronen stehen damit einerseits zur Bildung des Reduktionsäquivalents NADH zur Verfügung (Bresseur *et al.*, 2002; Valdés *et al.*, 2008), andererseits zum Aufbau eines Protonengradienten, welcher zur Bildung von ATP genutzt werden kann und zudem zum Absinken des pH-Wertes im umgebenden Medium führt (Valdés *et al.*, 2008). Da der S-Layer durch die komplexierten  $\text{Fe}^{3+}$ -Ionen lediglich den lokalen Abbau von Pyrit erhöht und im Kontaktbereich quasi als Katalysator wirkt, ist dieses Protein nicht zwingend für die Pyritoxidation und damit für die Lebensfähigkeit der Organismen nötig. Die Menge des dem Medium zugesetzten Pyrits ist so hoch, dass der Labormutante durch den fehlenden S-Layer keine Nachteile entstehen. Biotisch gebildetes  $\text{Fe}^{3+}$  oxidiert Pyrit auch ohne einen direkten Kontakt mit der Zelle, setzt  $\text{Fe}^{2+}$  frei und ermöglicht so ein Wachstum. Dass die  $\text{Fe}^{3+}$ -Konzentration im Medium dadurch bis zu sechsmal höher ist, haben vergleichende Analysen der Stämme SP5/1 und  $\Delta\text{Slp90}$  gezeigt. Darüber hinaus verhindert die geringere Menge an  $\text{Fe}^{3+}$  bei SP5/1 unter anderem die Bildung von Jarosit (Daoud und Karamanev, 2006), einem amorphen Eisenpräzipitat mit der Zusammensetzung  $[\text{HFe}_3(\text{SO}_4)_2(\text{OH})_6]$ , welches gelb-orange Präzipitate ausbilden kann. In den Flüssigkulturen der Labormutante traten diese Präzipitate im Laufe der Inkubation ab einer  $\text{Fe}^{3+}$ -Konzentration im Bereich von 0.5 mg/ml auf. Einhergehend mit dieser Beobachtung fällt der pH-Wert in den Kulturen von  $\Delta\text{Slp90}$  lediglich auf 1.5, verglichen mit 1.0 beim Stamm SP5/1. Bei  $\Delta\text{Slp90}$  liegt ein Teil der Protonen vermutlich gebunden in Jarosit vor.

Dies lässt die bisherige Annahme, dass das EPS für die Komplexierung von  $\text{Fe}^{3+}$  verantwortlich ist unter einem völlig anderen Licht erscheinen (Gehrke *et al.*, 1998; Sand und Gehrke, 2006): Mit dem S-Layer konnte ein Protein isoliert werden, welches entweder alleine für die Komplexierung von  $\text{Fe}^{3+}$  in der Zellwand verantwortlich ist oder zur EPS-Komplexierung in hohem Maße beiträgt.

Zukünftige Experimente sollen neben dem Einfluss des Kohlenhydratanteils des S-Layers auch dessen Kapazität und Affinität hinsichtlich einer  $\text{Fe}^{3+}$ -Bindung klären.

### 2.3 S-Layer, Porin oder doch EPS?

Es bleibt an dieser Stelle noch zu klären, ob die Rolle und die Identität des S-Layers zweifelsfrei festgestellt werden konnte oder ob es sich dabei nicht auch um ein Porin oder eine Komponente des EPS handeln könnte. Der Nachweis von Porinen in der äußeren Membran konnte für die *Acidithiobacillus*-Stämme SP5/1,  $\Delta\text{Slp90}$  und HV2/2 erbracht werden. Infolge einer bedingten Übereinstimmung von Slp90 mit Porinen der äußeren Membran sind Zweifel hinsichtlich der Identität des S-Layers durchaus berechtigt. Zumindest für *Thermus thermophilus* war bei P100 die Unterscheidung zwischen einem gleichmäßig angeordnetem Porin der äußeren Membran und einem S-Layer Proteingitter nicht eindeutig (Engelhardt und Peters, 1998). Dem entgegen zu halten ist aber, dass sich Porine in Gram-negativen Bakterien (Schirmer, 1998) oder auch bei *Thermotoga maritima* (Rachel *et al.*, 1990) in der Regel als Trimere anordnen. Die daraus resultierende p3-Symmetrie ist aber klar von der p2-Symmetrie des S-Layers in *Acidithiobacillus* zu unterscheiden und schließt so einen Zusammenhang zumindest mit klassischen Porinen aus.

Interessanter erscheint da die Auseinandersetzung mit dem Thema ‚Extrazelluläre polymere Substanz‘ (EPS). Anhand der rasterelektronenmikroskopischen Darstellung des Isolates SP5/1 war ersichtlich, dass sowohl der S-Layer wie auch das EPS parallel auftreten und daher das regelmäßige Oberflächenprotein als zusätzliche Struktur zwischen äußerer Membran und der extrazellulären polymeren Substanz zu sehen ist. Damit sind vermutlich auch bestimmte Charakteristika des EPS auf den S-Layer zurückzuführen.

Viele Isolierungsprotokolle der extrazellulären Substanz sind vom experimentellen Aufbau mit differentieller Zentrifugation und der Behandlung mit Detergenzien wie TritonX-100 (Lazar, 2004) sehr ähnlich der Methode, die in dieser Arbeit zur Anwendung kam. Allerdings fehlten in früheren Experimenten weiterführende, proteinbiochemische Analysen und elektronenmikroskopischen Untersuchungen, so dass der S-Layer verborgen blieb. Stattdessen galt das Hauptaugenmerk bei den EPS-Charakterisierungen den damit aufgereinigten Lipiden und Zuckerresten (Gehrke *et al.*, 1998). So konnten unter anderem Rhamnose, Fucose, Xylose, Mannose, Glukose und Glukuronsäure isoliert und die

zugrundeliegenden Gencluster identifiziert werden (Barreto *et al.*, 2005). Einige dieser Zucker, wie zum Beispiel Rhamnose, Fucose und Mannose sind jedoch auch als Bestandteil von S-Layern sowie dem O-Antigen im LPS Gram-negativer Bakterien beschrieben worden (Messner und Schäffer, 2000). Des Weiteren können in den EPS-Präparationen durchaus Lipidrückstände aus der Detergenzextraktion der äußeren Membran auftreten, welche damit nicht als Komponente des EPS sondern lediglich als Präparationsartefakte oder Verunreinigungen zu definieren wären (vgl. Veith *et al.*, 2009). Messungen bezüglich der Dicke und Oberflächendichte des extrazellulären Polymers bei *A. ferrooxidans* DSM 14882<sup>T</sup> zeigten, dass es eine vertikale Ausdehnung im Bereich von 8.1 bis 46.1 nm besitzt (Taylor und Lower, 2008). Bei einer durchschnittlichen Mächtigkeit des S-Layers von 8 bis 10 nm ist es durchaus denkbar, dass in den betreffenden Versuchsreihen nicht die Ausmaße des EPS, sondern die des Oberflächenproteins ermittelt wurden. Dass Beschreibungen eines S-Layers innerhalb der Gattung *Acidithiobacillus* bisher ausblieben, erscheint nachvollziehbar, wenn man einerseits die Bildung von Labormutanten in Betracht zieht und andererseits auf die Schwierigkeiten bei der Präparation des S-Layers beim Isolat HV2/2 hinweist (Klingl, 2007). Erst durch eine zusätzlich chemische Fixierung mit Glutardialdehyd konnte die Struktur visualisiert werden. Außerdem würde eine schwache Bindung des S-Layers an die äußere Membran zu einer erhöhten Sensitivität gegenüber chemischer und mechanischer Einwirkungen führen und möglicherweise den Verlust des Proteins während der Präparation zur Folge haben (Engelhardt und Peters, 1998). Letztendlich ist auch eine Lokalisierung des S-Layer-Gens auf einem Plasmid nicht auszuschließen. Einige dieser Plasmide in unterschiedlichen Stämmen der Spezies *A. ferrooxidans* und *A. caldus* verleihen den Organismen eine verbesserte Widerstandsfähigkeit gegenüber Arsen sowie hohen  $Zn^{2+}$ -,  $Fe^{3+}$ - und  $Cu^{2+}$ -Konzentrationen und könnten deshalb mit einem  $Fe^{3+}$ -komplexierenden S-Layer in Verbindungen stehen (Kondrat`eva *et al.*, 2002; Zyl *et al.*, 2008). Aufgrund der großen Variabilität in den Plasmidprofilen der untersuchten Stämme besteht die Möglichkeit, dass der Verlust des entsprechenden Plasmids auch zum Verlust des S-Layers führen könnte.

### **3 Der S-Layer von *M. sedula* und dessen Rolle bei der Interaktion mit Pyrit**

Mit den Untersuchungen am S-Layer von *M. sedula* TH2 konnten die bisherigen Kenntnisse zum typischen strukturellen Aufbau der Zellwand innerhalb der Sulfolobales bestätigt und ergänzt werden. Die gelappt kokkoiden Zellen sind mit einem S-Layer bedeckt, welcher eine für diese Familie typische p3-Symmetrie aufweist und zusammen mit der Cytoplasmamembran einen etwa 20 nm weiten pseudoperiplasmatischen Raum aufspannt (Baumeister

und Lembcke, 1992). Untersuchungen bezüglich der Gitterkonstanten, der Massenverteilungen von Proteinen und des Erscheinungsbildes des S-Layers im Elektronenmikroskop lieferten für alle Vertreter redundante Ergebnisse (Taylor *et al.*, 1982; Deatherage *et al.*, 1983; Prüschenk und Baumeister, 1987; Prüschenk *et al.*, 1987; Lembcke *et al.*, 1991; 1993; Grogan, 1996, Klingl, 2007). Die große S-Layer-Untereinheit SlaA, welche quasi ein Dach aufspannt, wird über die kleine Untereinheit SlaB, vergleichbar mit einer Säule, in der Plasmamembran verankert. Letztere formt dabei ein Trimer und wird als Stalk bezeichnet. Im Aufbau des S-Layers aus zwei Proteinen unterscheiden sich die Sulfolobales von den meisten anderen Archaeen, welche in der Regel nur über ein S-Layer Protein verfügen (Grogan, 1989; 1996; Claus *et al.*, 2002). Auf genetischer Ebene konnte für die S-Layer-Untereinheiten die Anordnung in einem Operon nachgewiesen werden (Veith *et al.*, 2009). Obwohl das komplette Genom von *M. sedula* verfügbar ist (Auernik *et al.*, 2008), verhinderte der geringe Konservierungsgrad der SlaA Proteine bislang eine Identifizierung in dieser Spezies (Veith *et al.*, 2009). Das Protein Msed\_1806, welches durch eine MS/MS-Analyse der tryptischen Peptidsequenzen als SlaA in *M. sedula* bestätigt werden konnte, lieferte bei einer NCBI Recherche keine Treffer zu bekannten SlaA Sequenzen anderer Sulfolobales. In Übereinstimmung mit den N-terminalen Bereichen der SlaA Proteine in *A. ambivalens*, *S. solfataricus* und *S. acidocaldarius* (König *et al.*, 2007) verfügt das unprozessierte Protein Msed\_1806 über ein Signalpeptid, welches für den Transport über die Cytoplasmamembran verantwortlich ist und beim reifen Protein nicht mehr vorkommt (Albers und Driessen, 2002; Veith *et al.*, 2009). Selbiges trifft auch auf die kleine S-Layer-Untereinheit SlaB zu.

Der Konservierungsgrad der Aminosäuresequenz von SlaB war verglichen mit SlaA weitaus höher, was die Zuordnung des entsprechenden Proteins Msed\_1807 in *M. sedula* erheblich erleichterte (vgl. Abbildung 46 C). Sämtlichen SlaB-Proteinen gemeinsam war jeweils ein N-terminales Signalpeptid mit einer Transmembranhelix, eine weitere Transmembranhelix am C-terminalen Ende des Proteins und eine davor geschaltete Coiled-coil-Domäne (Veith *et al.*, 2009). Der Vergleich der SlaB-Proteinsequenzen der Sulfolobales mit Daten anderer Organismen führte größtenteils zu Treffern innerhalb der Crenarchaeota. Die entsprechenden Proteine waren zumeist als potentielle S-Layer Proteine annotiert, darunter auch Tetrabrachion aus *S. marinus* (Peters *et al.*, 1995; 1996). Über die C-terminale Transmembranhelix wird SlaB in der Cytoplasmamembran verankert, vergleichbar dem S-Layer Glykoprotein der Haloarchaea (Kessel *et al.*, 1988; Sumper *et al.*, 1990). Allerdings besteht dieses nur aus einer Untereinheit und unterscheidet sich damit ebenso wie durch die fehlende Coiled-coil-Domäne von den S-Layern der Sulfolobales (Veith *et al.*, 2009). Sie umfasst zwischen 80 und 141 Aminosäuren, die entsprechend den Strukturvorhersagen eine amphipatische  $\alpha$ -Helix mit einer Länge von 17 bis 20nm formen, womit sich die theoretisch berechnete Weite des Pseudoperiplasmas mit elektronenmikroskopischen Beobachtung an

Dünnschnitten in etwa decken würden (Prüschenk und Baumeister, 1987; Baumeister *et al.*, 1991; Lembcke *et al.*, 1991; 1993; Baumeister und Lembcke, 1992; Klingl, 2007). Durch den amphiphatischen Charakter des Stalks tritt durch Wasserausschluss der hydrophoben Bereiche eine Oligomerisierung (Trimer) auf, allerdings nicht wie beim Tetrabrachion in *S. marinus* in Form eines Tetramers, sondern als Trimer (Peters *et al.*, 1995; 1996); die hydrophoben Reste der Coiled-coil-Domäne weisen dabei stets zum Zentrum des Oligomers. Vorhersagen verschiedener 3D-Strukturprogramme führten meist zu ähnlichen Ergebnissen. Ihnen gemein war der Aufbau aus mehreren aufeinanderfolgenden Beta-sandwich-Domänen, welche über eine flexible Linker-Domäne miteinander verbunden waren. Aufgrund dessen ist die angesprochene Trimerisierung der Coiled-coil-Domänen der SlaB-Proteine im Einklang mit der stets beobachteten dreizähligen Symmetrie der S-Layer bei den Sulfolobales (Lembcke *et al.*, 1991; Baumeister und Lembcke, 1992; König *et al.*, 2007; Veith *et al.*, 2009). Für den restlichen N-terminalen Bereich des SlaB-Proteins weisen die Vorhersageprogramme zwei bis drei aufeinanderfolgende Beta-Sandwich-Domänen aus. Insgesamt gesehen scheint bei zahlreichen S-Layer Proteinen, sowohl aus Bakterien als auch aus Archaeen, eine Serie dieser Domäne als gemeinsames Merkmal aufzutreten (Veith *et al.*, 2009). Auch die Sekundärstruktur des SlaA Proteins scheint größtenteils Beta-Faltblatt-Charakter zu haben, jedoch waren Strukturvorhersagen in diesem Fall deutlich erschwert und führten zu teilweise stark abweichenden Ergebnissen. Schließlich wurde ein Modell auf Grundlage der extrazellulären Lipase von *Pseudomonas sp.* MIS38 (2Z8X) aufgrund der Deckungsgleichheit mit dem Schema aus Veith *et al.* (2009) ausgewählt. SlaA bildet stets ein Dimer, wobei sich jeweils drei Dimere um den Stalk, bestehend aus einem SlaB Trimer anordnen. Die so entstehenden triangulären Strukturen berühren dabei mit den Ecken diejenigen des nächsten Trimers und führen auf diese Weise zu einem regelmäßig wiederkehrenden Muster. Aufgrund der gesammelten Erkenntnisse wird eine  $\alpha_6\beta_3$  Stöchiometrie der, dem Kristallgitter zugrundeliegenden, Einheitszelle des S-Layers vorgeschlagen (Veith *et al.*, 2009). Jede Abweichung von diesem Verhältnis würde eine bisher bei den Sulfolobales nicht beobachtete Veränderung der Symmetrie des S-Layers zur Folge haben. Für die Verbindung zwischen SlaA und SlaB gibt es mehrere Ideen. Durch eine Rückfaltung des N-terminalen Abschnitts von SlaB würde eine große konische Auflagefläche gebildet, auf welche sich SlaA auflagert (Veith *et al.*, 2009). Möglicherweise durchdringt SlaB auch das Dach des S-Layers, gebildet aus den SlaA Einheiten. Vergleichbar mit der Form eines Pilzes würde SlaB die großen Untereinheiten von oben festhalten und dem S-Layer gleichzeitig eine gewisse Stabilität gegen einen zellulären Turgordruck und verbunden damit eine mögliche Funktion verleihen (Engelhardt, 2007a, b).

Eine weitere Funktion des S-Layers besteht möglicherweise in dessen Interaktion mit Pyrit. In dieser Studie wurde zusammen mit Resultaten früherer Untersuchungen (Klingl, 2007)

eine Adhäsion von *M. sedula* TH2 und *S. metallicus* Kra23 auf Pyritkristallen sowie auf Kohle-befilmten Goldgrids gezeigt, jedoch nicht auf Glas, Glimmer, Kunststoff und Holz. Ungewöhnlich war, dass auch *S. solfataricus* P2 und PBL2025, welche zu keiner Pyrit-oxidation fähig sind, in begrenztem Maße auf der Erzoberfläche adhärten. Auf Glas und Glimmer erreichten die Stämme P2 und PBL2025 unter der Ausbildung von Flagellen, Pili und EPS-artiger Strukturen zumeist hohe Zelldichten (Zolghadr *et al.*, 2010). Die Flagellen- bzw. Pilimutanten  $\Delta$ flaJ und  $\Delta$ upsE zeigten keinerlei Adhäsion an die erwähnten Oberflächen. Hinsichtlich der Tatsache, dass bei *M. sedula* TH2 mit einer einzigen Ausnahme niemals Zellanhänge gezeigt werden konnten und für *S. metallicus* Kra23 nur vereinzelt wenige Pili (Klingl, 2007), ist davon auszugehen, dass die Adhäsion an Glas oder Glimmer in erster Linie über Pili und Flagellen vermittelt wird. Hierfür spricht, dass die Deletionsmutanten ein ähnliches Interaktionsverhalten zeigten. Flagellen, welche unter anderem bei der Oberflächenadhäsion und der Ausbildung von Zell-Zell-Kontakten in *P. furiosus* und *M. kandleri* eine Rolle spielen, sind vermutlich für die Erkennung der Oberfläche und die Herstellung des ersten Kontakts verantwortlich (Zolghadr *et al.*, 2010). Flagellen und Pili scheinen auch hinsichtlich der Ausbildung von Biofilmen bei *S. solfataricus* eine grundlegende Rolle zu spielen (Koerdt *et al.*, 2010). Zur dauerhaften Interaktion bzw. Biofilmbildung bedarf es der Pili bzw. des EPS. Für die Kultivierung von *E. coli* K-12 auf Glasoberflächen ist die Bildung von EPS als Matrix für die Entwicklung der Typ 1 Fimbrien und des Biofilms beschrieben (Rodrigues und Elimelech, 2009). EPS schafft dabei eine hydrophobe Umgebung für die ebenfalls hydrophoben Fimbrien auf der hydrophilen Oberfläche Glas. *S. solfataricus* bildet EPS ausschließlich auf Glas und Glimmer (beide hydrophil), nicht aber auf Kohle-befilmten Goldgrids (hydrophob). Auch hierfür könnte die Erklärung in der Bildung einer hydrophoben Grundlage für weitere Oberflächenstrukturen wie dem S-Layer und anderer glykosylierter Komponenten der Zelloberfläche liegen (Zolghadr *et al.*, 2010). Zusätzlich weisen Untersuchungen an bakteriellen EPS auf eine Funktion der Glykosylierung als Substratspeicher hin (Bejarano und Schneider, 2004; Decho und Kawaguchi, 1999; Hassan *et al.*, 2002; Laue *et al.*, 2006; Tsuneda *et al.*, 2003). Doch insbesondere der hohe Glykananteil, welcher bei *M. sedula* TH2 zu einem Massenshift im SDS-Gel von 143 auf etwa 180 kDa führt, dürfte einen nicht unerheblichen Anteil an der Adhäsion haben. Aktuell liegen bereits strukturelle Analysen des Glykananteils am S-Layer von *S. acidocaldarius* vor (Peyfoon *et al.*, 2010). Die Anwendung genetischer Methoden dürfte in diesem Zusammenhang zu neuen Erkenntnissen bezüglich des Glykosylierungswegs und der Funktion der Glykosylierung führen. Dass Veränderungen in der Glykanstruktur einen Effekt auf die Funktionalität haben können, wurde am Beispiel der Flagellen und des S-Layers bei *Methanococcus voltae*, *M. maripaludis* und *Haloferax volcanii* gezeigt (Jarrell *et al.*, 2010).

In die Adhäsion der Archaeen auf Pyriterzen ist in Anbetracht der vorliegenden Daten allem Anschein nach ausschließlich der S-Layer bzw. dessen Glykananteil involviert. Eine entsprechend positive Nettoladung der S-Layer Oberfläche würde zu einer elektrostatischen Anziehung mit dem unter physiologischen Bedingungen negativ geladenem Pyrit beitragen (Lazar, 2004).

## V Vorschläge zur Einordnung der Isolate SP5/1 und HV2/2 sowie Beschreibung einer neuen Spezies

### 1 Die Neueinordnung von „*Thiobacillus sphaeroides*“ SP5/1 als *A. ferrooxidans* comb. nov.

Aufbauend auf die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit wird vorgeschlagen, das Isolat SP5/1, welches bisher als „*Thiobacillus sphaeroides*“ bezeichnet wurde (Huber, 1987), als neuen Stamm innerhalb der Spezies *A. ferrooxidans* vorzuschlagen (DSM 24419). Dieser ist, abweichend vom Typstamm *A. ferrooxidans* DSM 14882<sup>T</sup>, nicht in der Lage, mit Tetrathionat als Energiequelle zu wachsen. Zusätzlich verfügt der Stamm über einen S-Layer mit p2-Symmetrie. Desweiteren wurde für das Isolat SP5/1 ein S-Layer-defizienter Laborstamm ΔSlp90 beschrieben.

Spezies / Stamm: *Acidithiobacillus ferrooxidans* SP5/1, Klingl *et al.*, 2011 (comb. nov.)

Acidophile und strikt aerobe Stäbchen, teilweise mit kokkoider Zellform; 1-2.5 x 0.7 µm; strikt chemolithotropher Stoffwechsel; Wachstum auf sulfidischen Erzen wie Pyrit, Chalkopyrit (Bad Grund, Norwegen) Sphalerit, Antimonit; Eisen-II-sulfat, elementarem Schwefel, Wasserstoff; Verdopplungszeit auf Eisensulfat bei 36 °C 2.5 h. 98.5 % Ubichinon 8; GC-Gehalt der DNA 60 mol %; S-Layer mit p2-Symmetrie (a: 15.6 nm; b: 6.4 nm; α: 82 °); Sequenzunterschied 16S rRNA zu *A. ferrooxidans* DSM 14882<sup>T</sup> 0.23 %.

### 2 Die Beschreibung der neuen Art *Acidithiobacillus striatothermus* sp. nov.

Aufgrund der vorliegenden Ergebnisse und Charakteristika wird an dieser Stelle die Beschreibung der neuen Spezies *Acidithiobacillus striatothermus* mit dem Typstamm HV2/2 vorgeschlagen.

Genus: *Acidithiobacillus* (Waksman und Jaffe, 1922; Kelly und Wood, 2000)

Obligat acidophile (pH-Optimum < 4.0) und aerobe, Gram-negative Stäbchen (0.4 x 2.0 µm), beweglich mit einer oder mehreren Flagellen. Verwendung reduzierter Schwefelverbindungen für autotrophes Wachstum. Einige Spezies sind in der Lage, Fe<sup>2+</sup>, natürliche oder synthetische Metallsulfide für die Energiegewinnung zu nutzen;

die Oxidation von Wasserstoff ist für einige Spezies beschrieben. Temperatur-Optimum zwischen 30 und 35 °C für mesophile und 45 °C für moderat thermophile Spezies. Enthalten Ubiquinon Q-8. Der G+C-Gehalt der DNA beträgt 52 – 64 mol %. Weitere generelle Charakteristika entsprechen *Thiobacillus*. Gehört zu den – Proteobakterien. Die Typspezies ist *Acidithiobacillus thiooxidans* (ursprünglich *Thiobacillus thiooxidans*; Waksman und Jäfte, 1922).

Spezies: *Acidithiobacillus striatothermus*, Klingl *et al.*, 2011 (sp. nov.); *stria.to.ther´mus*. L. masc. *striatus* Streifen; L. masc. adj. *thermus* heiß. *striatothermus* heiß, mit Streifen.

Acidophile und strikt aerobe Stäbchen; 1-2.5 x 0.7 µm; chemolithotropher Stoffwechsel; Wachstum auf sulfidischen Erzen wie Pyrit, Chalkopyrit und Sphalerit, Eisen-II-sulfat, elementarem Schwefel, Tetrathionat, Wasserstoff; heterotrophes Wachstum auf Schwefel in Verbindung mit Trypton, Hefeextrakt oder Glukose; Verdopplungszeit auf Schwefel mit Trypton bei 45 °C 13.4 h; S-Layer mit p2-Symmetrie (a: 16.1 nm; b: 6.3 nm; α: 81.3 °).

Typstamm: HV2/2 (DSM 24413)

## VI Zusammenfassung

Anhand physiologischer und morphologischer Untersuchungen an den  $\gamma$ -Proteobakterienstämmen SP5/1 und HV2/2 sollten Einsichten über deren Einordnung innerhalb der Gattung *Acidithiobacillus* erlangt werden. Zusätzlich waren die Charakterisierung der Surface Layer des *Acidithiobacillus*-Isolates SP5/1 und von *M. sedula* TH2, sowie deren mögliche Funktionen und ihre Rolle bei der Interaktion mit Oberflächen von besonderem Interesse.

Angesichts der Ergebnisse, welche aus der Sequenzierung der 16S rRNA Gene und der physiologischen Tests gewonnen wurden, war es möglich, den bisher als „*T. sphaeroides*“ Stamm SP5/1 der bestehenden Spezies *A. ferrooxidans* zuzuordnen. Für den Stamm HV2/2 existieren zwar zahlreiche Gemeinsamkeiten mit *A. caldus* DSM 8584<sup>T</sup>, jedoch wurden insbesondere die Fähigkeit zur Oxidation von Pyrit und Fe<sup>2+</sup> sowie eines S-Layers mit p2-Symmetrie als ausschlaggebende Kriterien herangezogen, die Beschreibung einer neuen Spezies *A. striatothermus* vorzuschlagen.

Durch den S-Layer defizienten Laborstamm  $\Delta$ Slp90 war es gelungen, das S-Layer-Protein Slp90 im Stamm SP5/1 zu identifizieren. Proteinanalytische Untersuchungen erlaubten jedoch, neben dem Nachweis weiterer Proteine der äußeren Membran, lediglich die Bestimmung der N-terminalen Aminosäuresequenz des S-Layers. Eine bedingte Übereinstimmung mit dem potentiellen S-Layer Afe\_2303 aus *A. ferrooxidans* DSM 14882<sup>T</sup> führten zu der Erkenntnis, dass es sich bei Slp90 vermutlich um den C-terminalen Bereich des nativen Proteins handelt. Vergleichende Untersuchungen am Isolat SP5/1 und dem Stamm  $\Delta$ Slp90 lieferten Hinweise auf mögliche Funktionen des S-Layers. Aufgrund signifikant reduzierter Fe<sup>3+</sup>-Konzentrationen in Kulturen des Stammes SP5/1 wird die Fähigkeit zur Komplexbildung von Fe<sup>3+</sup> angenommen. Gestützt wird dies durch den Nachweis von Eisen in den äußeren Zellwandschichten des Wildtyps mittels EDX-Analyse. Darüber hinaus ist bei dem Laborstamm  $\Delta$ Slp90 eine deutlich schwächere Ausprägung der Stäbchenform zu beobachten, wodurch dem S-Layer zwar keine Zellform-bestimmende, jedoch eine Zellform-erhaltende Funktion zuzuschreiben. Die Interaktion mit Oberflächen wie Pyrit wird vermutlich nicht durch den S-Layer vermittelt, sondern vielmehr durch andere zelluläre Strukturen wie Pili, Flagellen oder EPS. Der Nachweis von S-Layer mit p2-Symmetrie in den Typstämmen *A. ferrooxidans* DSM 14882<sup>T</sup> und *A. thiooxidans* DSM 147887<sup>T</sup> lassen vermuten, dass es sich bei dem regelmäßigen Oberflächenprotein um ein Gattungsspezifisches Kriterium handeln könnte.

Untersuchungen an dem Pyrit-oxidierenden Crenarchaeon *M. sedula* TH2 ermöglichten die Zuordnung der Gene *msed\_1806* und *msed\_1807* zur großen S-Layer-Untereinheit SlaA bzw. der kleinen Untereinheit SlaB. In Übereinstimmung mit weiteren Vertretern der Sulfolobales konnte eine Anordnung der Gene in Form eines Operons sowie die

---

Glykosylierung des S-Layers nachgewiesen werden. Hinsichtlich der Adhäsion von *M. sedula* TH2 und *S. metallicus* Kra23 ist nur auf Pyritoberflächen eine Interaktion des S-Layers zu erwarten. Experimente mit diesen Spezies, den *S. solfataricus* Stämmen P2 und PBL2025 sowie zweier Mutanten führten zu der Erkenntnis, dass auf Oberflächen wie Glas, Glimmer oder Kohle-befilmten Goldgrids das Vorhandensein von Zellanhänge wie Pili und Flagellen als Voraussetzung für eine Adhäsion anzusehen ist.

## VII Anhang

### 1 Abkürzungsverzeichnis

Die Verwendung chemischer Elementsymbole entsprach den Richtlinien der IUPAC.

Abkürzung	Bedeutung
AA	Acrylamid
AMD	<i>Acid mine drainage</i>
A.O.U.H.	Substitutionslösung für Gefriersubstitution: Aceton/Osmium/Uranylacetat/Wasser
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäure
BBR	Bakterienbank Regensburg
BCIP	5-Bromo-4-Chloro-3-Indoyle-Phosphat
bp	Basenpaare
BPB	Bromphenolblau
BSA	Bovines Serumalbumin
DDM	n-Dodecyl-beta-D-maltopyranosid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTT	D,L-Dithiothreitol
Ed.	Edition
ed(s).	Editor(en)
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EDX	Energy dispersive X-ray spectroscopy, Energie-dispersive Röntgen-Spektroskopie
E.G.F.U.	Substitutionslösung für Gefriersubst.: Ethanol/Glutaraldehyd/Formaldehyd/Uranylacetat
EPS	Extrazelluläre polymere Substanz
<i>e-value</i>	<i>Expectation value</i>
Ferrozin	3-(2-Pyridyl)-5,6-diphenyl-1,2,4-triazine-4',4''-disulfonsäure, Natriumsalz
FPLC	<i>Fast protein liquid chromatography</i>
g	Erdbeschleunigung; $g = 9.81 \text{ m/s}^2$
G1	Erzmischung aus 1/4 Pyrit, 1/4 Chalkopyrit, 1/4 Sphalerit, 1/4 Pechblende
G1N	Erzmischung aus 1/3 Pyrit, 1/3 Chalkopyrit (Norwegen), 1/3 Sphalerit
G6	Erzmischung aus 1/2 Pyrit, 1/2 Sphalerit
h	Stunde
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HF	Flusssäure

K	Kelvin
kb	Kilobasen
kDa	Kilo Dalton = 1000 g/mol
kV	1000 Volt
L	Liter
LN <sub>2</sub>	Flüssiger Stickstoff
LPS	Lipopolysaccharid
MALDI-MS	<i>Matrix Assisted Laser Desorption/Ionisation mass spectrometry</i>
MES	2-(N-Morpholino-) Ethansulfonsäure
min	Minute
ml	Milliliter
MM	Magermilch
mm	Millimeter
mod.	modifiziert
MS	Massenspektrometrie
MS/MS	Tandem-Massenspektrometrie
MW	Molekulargewicht
ORF	<i>Open reading frame</i> ; offenes Leseraster
p.a.	zur Analyse
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBG	<i>Phosphate buffered gelatin</i>
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i>
PCR	Polymerase-Kettenreaktion ( <i>polymerase chain reaction</i> )
pers.	persönlich
pH	pondus hydrogenii (Wasserstoff-Exponent)
pI	isoelektrischer Punkt
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PK	Pyrit aus Kiel
PVDF	Polyvinylidendifluorid
REM	Rasterelektronenmikroskop
RISC	Reduzierte anorganische Schwefelverbindung ( <i>reduced inorganic sulfur compound</i> )
RT	Raumtemperatur
s.a.	siehe auch
S	Sedimentationskoeffizient
SDS	<i>Sodium dodecyl sulfate</i> , Natriumdodecylsulfat

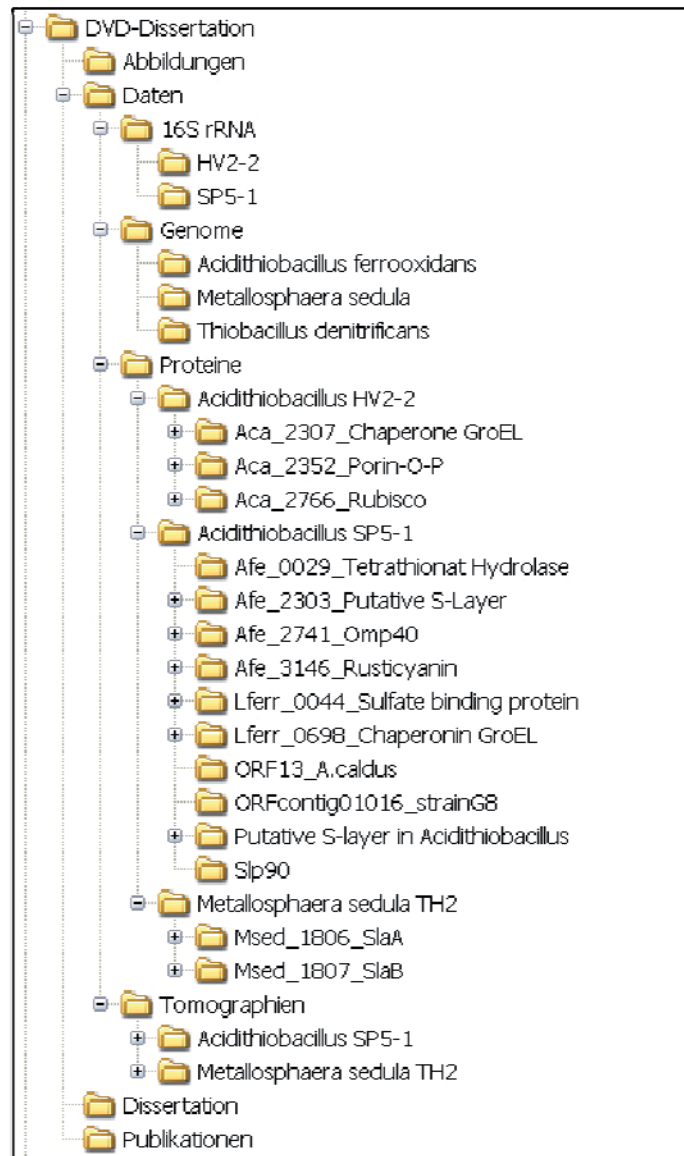
SDS-FRL	SDS <i>digested freeze fracture replica labeling</i>
sec	Sekunde
SEM	<i>Scanning electron microscope</i> (Rasterelektronenmikroskop)
S-Layer	<i>Surface layer</i>
sp.	Spezies
STABLE	<i>Stalk-associated Protease (Staphylothermus marinus)</i>
(T)EM	(Transmissions-) Elektronenmikroskop
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
T <sub>m</sub>	Schmelztemperatur (Primer)
TMH	Transmembran-Helix
TOF	<i>Time of flight</i>
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
u.a.	unter anderem
UV	Ultraviolett
UZ	Ultrazentrifugation bzw. Ultrazentrifuge
v/v bzw. w/v	Volumen pro Volumen bzw. Gewicht pro Volumen
vgl.	vergleiche

**Tabelle 30:** Abkürzungsverzeichnis.

## 2 Begleit-DVD

Die Gliederung der beiliegenden DVD erfolgte in drei Hauptordner: ‚Abbildungen‘, ‚Daten‘ und ‚Publikationen‘. Unter ‚Abbildungen‘ finden sich alle Grafiken und Illustrationen entsprechend ihrer Benennung in dieser Arbeit, ergänzt durch ein Abbildungsverzeichnis. Der Ordner Daten fasst unter anderem die Sequenzen der 16S rRNA Gene der Stämme SP5/1 und HV2/2 sowie die Genome von *A. ferrooxidans*, *T. denitrificans* und *M. sedula* im FSA-Format zusammen. Zusätzlich finden sich hier die Daten aus den Analysen der untersuchten Proteine sowie die Ergebnisse der Strukturvorhersagen für die Isolate SP5/1, HV2/2 und *M. sedula* TH2 in dem Ordner ‚Proteine‘ zusammengefasst (Abbildung 45). Dabei wurden die Resultate, welche mit den unterschiedlichen Programmen und Servern gewonnen wurden unter dem Namen des entsprechenden Proteins abgelegt. Der Ordner ‚Tomographien‘ beinhaltet darüberhinaus sämtliche Videos, welche anhand der elektronentomographischen Untersuchungen an den Kontaktstellen von Mikroorganismen mit Pyrit in IMOD generiert wurden. Zusammen mit den jeweiligen Modellen wurden für den Stamm SP5/1 insgesamt vier Videos (Kippserie, Modell-Kontaktstelle, Modell-Zellwand, Tomogramm) und für *M. sedula* TH2 drei Videos (Kippserie, Modell, Tomogramm), jeweils im

AVI- (Quick Time Player, QuickTime™) und im MOV-Format (Windows Media Player, © Microsoft Corporation) beigefügt. Zusätzlich wurden die in der Publikationsliste angeführten Dokumente in dem Ordner ‚Publikationen‘ zusammengefasst und eine Version der Dissertation als pdf-Datei in ‚Dissertation‘ beigefügt.



**Abbildung 45:** Begleit-DVD: Übersicht der enthaltenen Daten.

### 3 Tabellen

#### 3.1 Verwendete Organismen

Kultur	Stamm	Kultursammlung	Herkunft	Literatur
<i>Thiobacillus sphaeroides</i>	SP5/1	BBR DSM 24419	Pisciarelli Solfatara (Italien)	Huber <i>et al.</i> , 1986
S-Layer defizienter Laborstamm von SP5/1	ΔSlp90	BBR	Labor AG Rachel	-
<i>Acidithiobacillus</i> -Stamm	HV2/2	BBR DSM 24413	Hveravellier, (Island)	Huber H., pers. Mitteilung
<i>Metallosphaera sedula</i>	TH2	DSM 5348 <sup>T</sup> ATCC 51363 <sup>T</sup>	Pisciarelli Solfatara (Italien)	Huber <i>et al.</i> , 1989
<i>Sulfolobus metallicus</i>	Kra23	DSM 6482 <sup>T</sup>	Kraffla (Island)	Huber und Stetter, 1991
<i>Acidithiobacillus ferrooxidans</i>		DSM 14882 <sup>T</sup> ATCC 23270 <sup>T</sup>	-	Temple und Kolmer, 1951
<i>Acidithiobacillus thiooxidans</i>		DSM 14887 <sup>T</sup> ATCC 19377 <sup>T</sup>	Kimmeridge clay (UK)	Waksman und Jaffe, 1922
<i>Thiobacillus azoricus</i>	HW3	BBR	Azoren	Huber H., pers. Mitteilung
<i>Thiobacillus prosperus</i>	LM3	BBR DSM 5130 <sup>T</sup>	Geothermales Sediment Vulcano (Italien)	Huber und Stetter, 1989
<i>Thiobacillus plumbophilus</i>	Gro7	BBR DSM 6690	Uranmine Deutschland	Drobner <i>et al.</i> , 1992
<i>Thiomonas cuprina</i>	Hö5	BBR DSM 5495 <sup>T</sup>	Uranmine Poppenreuth Deutschland	Moreira und Amils, 1997; Kelly <i>et al.</i> , 2007
<i>Sulfolobus solfataricus</i>	PBL2025	-	-	Schelert <i>et al.</i> , 2004
<i>Sulfolobus solfataricus</i>	ΔflaJ	-	-	Zolghadr <i>et al.</i> , 2010
<i>Sulfolobus solfataricus</i>	ΔupsE	-	-	Zolghadr <i>et al.</i> , 2010
<i>Sulfolobus solfataricus</i>	P2	DSM 1617 JCM 11322	Campi felgrei (Italien)	Zillig <i>et al.</i> , 1980

**Tabelle 31:** Übersicht der, in Rahmen dieser Arbeit, untersuchten Mikroorganismen.

### 3.2 Verbrauchsmaterialien

Verbrauchsmaterial	Bezugsquelle
Deckgläser für Mikroskopie	Paul Marienfeld GmbH & Co. KG, Lauda-Königshofen
DryEase™ Mini Cellophane	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Einmalkanülen	Terumo Europe N.V., Leuven (Belgien)
Einmalskalpelle	VWR International GmbH, Darmstadt
Einmalspritzen 1 ml	Ersta, Asik, Dänemark
Einmalspritzen 5 ml, 10 ml, 20 ml	B. Braun Melsungen AG, Melsungen
Einwegpasteurpipetten (0.5 ml und 2.5 ml)	Roth, Karlsruhe
Eppendorf-Reaktionsgefäße (0.5, 1.5 und 2.0 ml)	Eppendorf AG, Hamburg; Roth, Karlsruhe
Filterpapier Whatman 3MM	Whatman Biometra GmbH, Göttingen
Gewebekultur-Platten, 24 well	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
Immersionsöl	Carl Zeiss AG, Oberkochen
Objektträger	Paul Marienfeld GmbH & Co. KG, Lauda-Königshofen
Papier-Rundfilter 45 mm, 90 mm	Schleicher Schuell GmbH, Dassel
Parafilm „M“® Laboratory Film	American National Can™, Chicago (USA)
Pasteurpipetten	Brand GmbH & Co. KG, Wertheim
PCR-Reaktionsgefäße (0.2 ml)	PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen
pH-Indikatorstäbchen	VWR International GmbH, Darmstadt
Pipettenspitzen	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
Plastikpetrischalen	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
PVDF-Membran Immobilon – P <sup>SQ</sup>	Millipore GmbH, Schwalbach
Schraubdeckelgefäße (Falcon Tube™), 15 und 50 ml	Roth, Karlsruhe
Sterilfilter, 0.2 µm Porenweite	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
Trägernetzchen für Elektronenmikroskopie	Plano GmbH, Wetzlar
- Kupfer (G400, Hex700)	
- Gold (G400)	
- Nickel (G100, G400)	

**Tabelle 32:** Bezugsquellen der Verbrauchsmaterialien.

### 3.3 Kippwinkel für Tomographie nach Saxton *et al.* (1984)

Tilt-Serie 1

	$\Delta\phi$ (rad)	$\Delta\phi$ (grad)	$\Phi$ (rad)	$\Phi$ (grad)
	0	0	0	0
	0.0833	4.77	0.0833	4.77
	0.0830	4.75	0.1663	9.53
	0.0822	4.71	0.2485	14.24
	0.0808	4.63	0.3293	18.87
M = 3800 x, Pix: 4.1 nm	0.0789	4.52	0.4082	23.39
Für $r/t = 1/12$ :	0.0765	4.38	0.4847	27.77
$r = 0.5$ nm, und $t = 6$ nm	0.0737	4.22	0.5584	31.99
bzw.	0.0707	4.05	0.6291	36.04
$r = 1$ nm, und $t = 12$ nm	0.0674	3.86	0.6965	39.91
bzw.	0.0639	3.66	0.7604	43.57
$r = 4$ nm, und $t = 48$ nm	0.0604	3.46	0.8208	47.03
bzw.	0.0568	3.25	0.8776	50.28
$r = 8$ nm, und $t = 96$ nm	0.0532	3.05	0.9308	53.33
	0.0498	2.85	0.9806	56.18
	0.0464	2.66	1.0270	58.84
	0.0431	2.47	1.0701	61.31

**Tabelle 33:** Tilt-Serie 1 nach Saxton *et al.* (1984).

## Tilt-Serie 2

	$\Delta\phi$ (rad)	$\Delta\phi$ (grad)	$\Phi$ (rad)	$\Phi$ (grad)
	0	0	0	0
	0.1000	5.73	0.1000	5.73
	0.0995	5.70	0.1995	11.43
M = 3800 x, Pix: 4.1 nm	0.0980	5.61	0.2975	17.05
	0.0956	5.48	0.3931	22.52
Für $r/t = 1/10$ :	0.0924	5.29	0.4855	27.82
$r = 1$ nm, und $t = 10$ nm	0.0884	5.06	0.5739	32.88
bzw.	0.0840	4.81	0.6479	37.69
$r = 2$ nm, und $t = 20$ nm	0.0791	4.53	0.7370	42.23
bzw.	0.0740	4.24	0.8110	46.47
$r = 5$ nm, und $t = 50$ nm	0.0689	3.95	0.8799	50.41
bzw.	0.0637	3.65	0.9436	54.06
$r = 10$ nm, und $t = 100$ nm	0.0587	3.36	1.0023	57.43
	0.0538	3.08	1.0561	60.51
	0.0492	2.82	1.1053	63.33
	0.0449	2.57	1.1502	65.90
	0.0408	2.34	1.1910	68.24

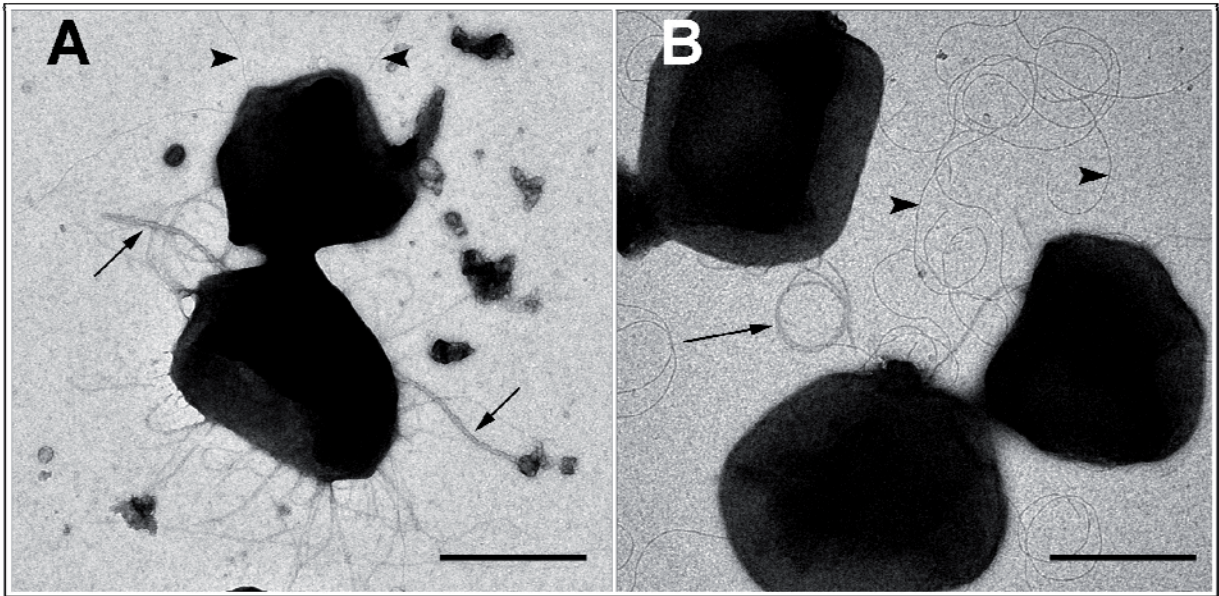
Tabelle 34: Tilt-Serie 2 nach Saxton *et al.* (1984).

### 3.4 Medienzusätze

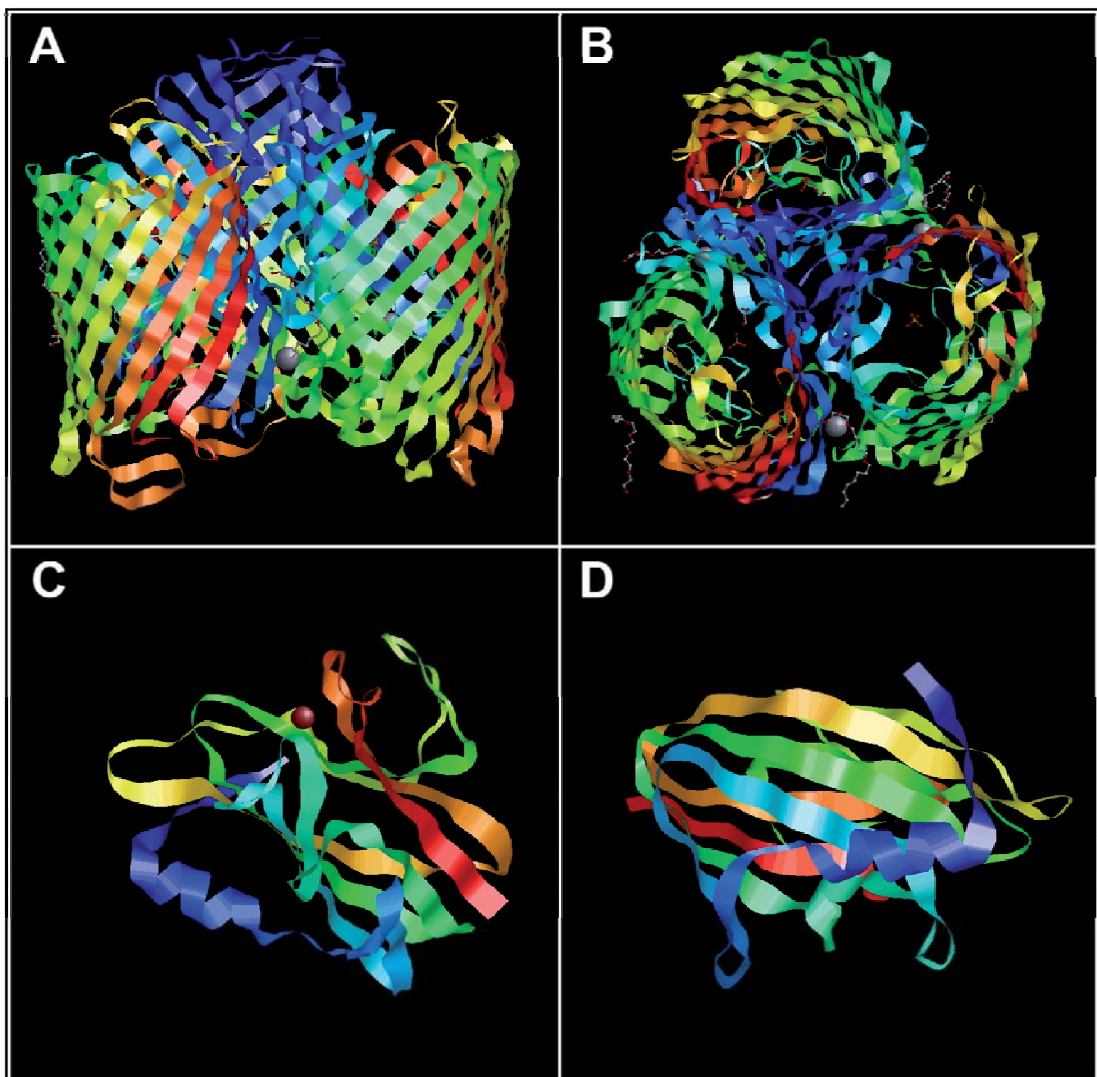
Wolfe`s Mineralien 10 x / pH 1.0 / neu – Titriplex

Substanz	Konzentration	Menge
MgSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O	121.7 mM	30.0 g
MnSO <sub>4</sub> x H <sub>2</sub> O	29.6 mM	5.0 g
NaCl	171.1 mM	10.0 g
FeSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O	3.6 mM	1.0 g
CoSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O	6.4 mM	1.8 g
CaCl <sub>2</sub> x 2H <sub>2</sub> O	6.8 mM	1.0 g
ZnSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O	6.3 mM	1.8 g
CuSO <sub>4</sub> x 5 H <sub>2</sub> O	0.4 mM	0.1 g
KAl(SO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> x 12 H <sub>2</sub> O	0.38 mM	0.18 g
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	1.62 mM	0.1 g
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> x 2 H <sub>2</sub> O	0.41 mM	0.1 g
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> Ni(SO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> x 6 H <sub>2</sub> O	7.09 mM	2.8 g
Na <sub>2</sub> WO <sub>4</sub> x 2H <sub>2</sub> O	0.3 mM	0.1 g
Na <sub>2</sub> SeO <sub>4</sub>	0.53 mM	0.1 g
H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub>		ad 1000.0 ml





**Abbildung 47:** *S. solfataricus* auf Kohle-befilmten Goldgrids. Die Inkubation erfolgte unter Standardbedingungen (II.4.2) für 2 Tage. Präparation entsprechend II.5.2. Negativkontrastierung mit UAc. Pfeilspitzen: Pili; Pfeile: Flagellen. Balken: je 1  $\mu\text{m}$ .



**Abbildung 48:** Graphische Darstellung von Proteinstrukturen. (A) und (B) Trimer des Membranproteins OprP aus *P. aeruginosa* (Morales *et al.*, 2007). MMDB ID: 43611; PDB ID: 2O4V. (C) und (D) Rusticyanin aus *A. ferrooxidans* (Walter *et al.*, 1996). MMDB ID: 57242; PDB ID: 1RCY. Seitenansicht (A, D) bzw. Aufsicht (B, C).

## VIII Literaturverzeichnis

- Abraitis P., Patrick R. und Vaughan D. (2004). Variations in the compositional, textural and electrical properties of natural pyrite: A review. *International Journal of Mineral Processing* 74: 41-59.
- Albers S.-V., und Driessen A.J.M. (2002). Signal peptides of secreted proteins in the archaeon *Sulfolobus solfataricus*: a genomic survey. *Archives of Microbiology* 177: 209-216.
- Albers S.-V., Szabó Z. und Driessen A. J. M. (2006). Protein secretion in the archaea: multiple paths towards a unique cell surface. *Nature Reviews Microbiology* 4: 537-547.
- Albers S.-V. und Pohlschröder (2009). Diversity of archaeal type IV pilin-like structures. *Extremophiles* 13: 403-410.
- Allen G. (1989). Sequencing of proteins and peptides. In: Laboratory techniques in biochemistry and molecular biology (Burdon R., Knippenberger P., eds). Elsevier, Amsterdam. The Netherlands.
- Allen M.B. (1959). Studies with *Cyanidium caldarium*, an anomalously pigmented chlorophyte. *Archives of Microbiology* 32: 270-277.
- Amouric A., Brochier-Armanet C., Barrie Johnson D., Bonnefoy V. und Hallberg K.B. (2011). Phylogenetic and genetic variation among Fe(II)-oxidizing acidithiobacilli supports the view that these comprise multiple species with different ferrous iron oxidation pathways. *Microbiology* 157: 111-122.
- Appia-Ayme C., Quatrini R., Denis Y., Denizot F., Silver S., Roberto F., Veloso F., Valdés J., Cárdenas J.P., Esparza M., Orellana O., Jedlicki E., Bonnefoy V. und Holmes D. (2006). Microarray and bioinformatic analyses suggest models for carbon metabolism in the autotroph *Acidithiobacillus ferrooxidans*. *Hydrometallurgy* 83: 273-280.
- Auernik K.S., Maezato Y., Blum p.H. und Kelly R.M. (2008). The genome sequence of the metal-mobilizing, extremely thermoacidophilic archaeon *Metallosphaera sedula* provides insights into bioleaching-associated metabolism. *Applied Environmental Microbiology* 74: 682-692.
- Barreto M., Jedlicki E. und Holmes D.S. (2005). Identification of a gene cluster for the formation of extracellular polysaccharide precursors in the chemolithoautotroph *Acidithiobacillus ferrooxidans*. *Applied Environmental Microbiology* 71: 2902-2909.
- Bashkatova N.A., Severina L.O., Golovacheva R.S. und Mityushina L.L. (1991). Surface layers of extremely thermoacidophilic archaeobacteria of the genus *Sulfolobus*. *Mikrobiologiya* 60: 90-94.
- Baumeister W., Wildhaber W. und Phipps B.M. (1989). Principles of organization in eubacterial and archaeobacterial surface proteins. *Canadian Journal of Microbiology* 35: 215-227.
- Baumeister W., Volker S. und Santarius U. (1991). The three-dimensional structure of the surface layer protein of *Acidianus brierleyi* determined by electron crystallography. *Systematic and Applied Microbiology* 14: 103-110.
- Baumeister W. und Lembcke G. (1992). Structural Features of Archaeobacterial Cell Envelopes. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes* 24: 567-575.
- Bayley D.P. und Koval S.F. (1994). Membrane association and isolation of the S-layer protein of *Methanoculleus marisnigri*. *Canadian Journal of Microbiology* 40: 237-241.

- Bejarano E.M. und Schneider R.P. (2004). Use of fluorescent lectin probes for analysis of footprints from *Pseudomonas aeruginosa* MDC on hydrophilic and hydrophobic glass substrata. *Applied Environmental Microbiology* 70: 4356-4362.
- Bennett-Lovsey R.M., Herbert A.D., Sternberg M.J. und Kelley L.A. (2008). Exploring the extremes of sequence/structure space with ensemble fold recognition in the program Phyre. *Proteins* 70: 611-625.
- Bergel A. (2007). Recent advances in electron transfer between biofilms and metals. *Advanced Materials Research* 20: 329-334.
- Bergonzelli G.E., Granato D., Pridmore R.D., Marvin-Guy L.F., Donnicola D. und Corthésy-Theulaz I.E. (2006). GroEL of *Lactobacillus johnsonii* La1 (NCC 533) is cell surface associated: Potential role in interactions with the host and the gastric pathogen *Helicobacter pylori*. *Infection and Immunity* 74: 425-434.
- Beveridge T.J., Pouwels P.H., Sára M., Kotiranta A., Lounatmaa K., Kari K., Kerosuo E., Haapasalo M., Egelseer E.M., Schocher I., Sleytr U.B., Morelli L., Callegari M.L., Nomellini J.F., Bingle W.H., Smit J., Leibovitz E., Lemaire M., Miras I., Salamitou S., Béguin P., Ohayon H., Gounon P., Matuschek M. und Koval S.F. (1997). Functions of S-layers. *FEMS Microbiology Reviews* 20: 99-149.
- Bingle W.H., Nomellini J.F. und Smit J. (1997). Linker Mutagenesis of the *Caulobacter crescentus* S-layer protein: toward a definition of an N-terminal anchoring region and a c-terminal secretion signal and the potential heterologous protein secretion. *Journal of Bacteriology* 179: 601-611.
- Blake R.C.II., Shute E.A. und White K.J. (1989). Enzymology of respiratory iron oxidation. *Biohydrometallurgy* 1: 391-401.
- Blum H., Beier H. und Gross H.J. (1987). Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA polyacrylamide gels. *Elektrophoresis* 8: 93-99.
- Bock K., Schuster-Kolbe J., Altman E., Allmaier G., Stahl B., Christian R., Sleytr U.B. und Messner P. (1994). Primary structure of the O-glycosidically linked glycan chain of the crystalline surface layer glycoprotein of *Thermoanaerobacter thermohydrosulfuricus* L111-69. *The Journal of Biological Chemistry* 269: 7137-7144.
- Boot H.J. und Pouwels P.H. (1996). Expression, secretion and antigenic variation of bacterial S-layer proteins. *Molecular Microbiology* 21: 1117-1123.
- Borinski R. und Holt S.C. (1990). Surface characteristics of *Wolinella recta* ATCC 33238 and human clinical isolates: correlation of structure with function. *Infection and Immunity* 58: 2770-2776.
- Brasseur G., Bruscella P., Bonnefoy V., Lemesle-Meunier D. (2002). The bc<sub>1</sub> complex of the iron-grown acidophilic chemolithotrophic bacterium *Acidithiobacillus ferrooxidans* functions in the reverse but not in the forward direction. Is there a second bc<sub>1</sub> complex? *Biochimica et Biophysica Acta* 1555: 37-43.
- Brock T.D., Brock K.M., Belly R.T. und Weiss R.L. (1972). *Sulfolobus*: a new genus of sulfur-oxidizing bacteria living at low pH and high temperature. *Archives of Microbiology* 84: 54-68.
- Bruscella P., Cassagnaud L., Ratuschniak J., Brasseur G., Lojou E., Amils R. und Bonnefoy V. (2005). The HiPIP from the acidophilic *Acidithiobacillus ferrooxidans* is correctly processed and translocated in *Escherichia coli*, in spite of the periplasm pH difference between these two microorganisms. *Microbiology* 151: 1421-1431.
- Bryner L., Beck J., Davis D. und Wilson D. (1954). Microorganisms in leaching sulfide minerals. *Industrial and Engineering Chemistry Research* 46: 2587-2692.
- Burghardt T. (2008). Einblicke in die Interaktion zwischen *Ignicoccus hospitalis* und *Nanoarchaeum equitans*: Das Membranprotein Ihomp1 sowie Nachweis weiterer

- Proteine der Zellhüllen. Lehrstuhl Mikrobiologie, Universität Regensburg. Dissertation.
- Casiot C., Egal M., Elbaz-Poulichet F., Bruneel O., Bancon-Montigny C., Cordier M., Gomez E. und Aliaume C. (2009). Hydrological and geochemical control of metals and arsenic in a Mediterranean river contaminated by acid mine drainage (the Amous River, France); preliminary assessment of impacts on fish (*Leuciscus cephalus*). *Applied Geochemistry* 24: 787-799.
- Cavazza C., Guigliarelli L., Bertrand P. und Bruschi M. (1995). Biochemical and EPR characterization of a high potential iron-sulfur protein in *Thiobacillus ferrooxidans*. *FEMS Microbiology Letters* 130: 193-199.
- Chen J., Anderson J.B., DeWeese-Scott C., Fedorova N.D., Geer L.Y., He S., Hurwitz D.I., Jackson J.D., Jacobs A.R., Lanczycki C.J., Liebert C.A., Liu C., Madej T., Marchler-Bauer A., Marchler G.H., Mazumder R., Nikolskaya A.N., Rao B.S., Panchenko A.R., Shoemaker B.A., Simonyan V., Song J.S., Thiessen P.A., Vasudevan S., Wang Y., Yamashita R.A., Yin J.J. und Bryant S.H. (2003). MMDB: Entrez's 3D-structure database. *Nucleic Acids Research* 31: 474-477.
- Cheong G.-W., Cejka Z., Peters J., Stetter K.O. und Baumeister W. (1991). The surface protein layer of *Methanoplanus limicola*: three-dimensional structure and chemical characterization. *Systematic and Applied Microbiology* 14: 209-217.
- Cherry D., Currie R., Soucek D., Latimer H. und Trent G. (2001). An integrative assessment of a watershed impacted by abandoned mined land discharges. *Environmental Pollution* 111: 377-388.
- Claus H., Akça E., Debaerdemaeker T., Evrard D., Declercq J.P. und König H. (2002). Primary structure of selected archaeal mesophilic and extremely thermophilic outer surface layer proteins. *Systematic and Applied Microbiology* 25: 3-12.
- Colmer A. und Hinkle M. (1947). The role of microorganisms in acid mine drainage. a preliminary report. *Science* 106: 253-256.
- Colmer A., Temple K. und Hinkle M. (1950). An iron-oxidizing bacterium from the acid mine drainage of some bituminous coal mines. *Journal of Bacteriology* 59: 317-328.
- Courtney L. und Clements W. (2000). Sensitivity to acidic pH in benthic invertebrate assemblages with different histories of exposure to metals. *Journal of the North American Benthological Society* 19: 112-127.
- Cowman M.K., Slahetka M.F., Hittner D.M., Kim J., Forino M. und Gadelrab G. (1984). Polyacrylamide-gel electrophoresis and alcian blue staining of sulphated glycosaminoglycan oligosaccharides. *Biochemical Journal* 221: 707-716.
- Daniel R.A. und Errington J. (2003). Control of cell morphogenesis in bacteria: two distinct ways to make a rod-shaped cell. *Cell* 113: 767-776.
- Daoud J. und Karamanev D. (2006). Formation of jarosite during Fe<sup>2+</sup> oxidation by *Acidithiobacillus ferrooxidans*. *Minerals Engineering* 19: 960-967.
- David C. (2003). Establishing the impact of acid mine drainage through metal bioaccumulation and taxa richness of benthic insects in a tropical Asian stream (the Philippines). *Environmental Toxicology and Chemistry* 22: 2952-2959.
- Deatherage J.F., Taylor K.A. und Amos L.A. (1983). Three-dimensional arrangement of the cell wall protein of *Sulfolobus acidocaldarius*. *Journal of Molecular Biology* 167: 823-848.
- Decho A.W. und Kawaguchi T. (1999). Confocal imaging of in situ natural microbial communities and their extracellular polymeric secretions using Nanoplast resin. *Biotechniques* 27: 1246-1252.

- Drobner E., Huber H., Rachel R. und Stetter K.O. (1992). *Thiobacillus plumbophilus* spec. nov., a novel galena and hydrogen oxidizer. *Archives of Microbiology* 157: 213-217.
- Duarte J.D., Estrada P.C., Pereira P.C. und Beaumont H.P. (1993). Thermophilic vs. mesophilic bioleaching process performance. *FEMS Microbiology Reviews* 11: 97-102.
- Edgar R.C. (2004). MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Research* 32: 1792-1797.
- Edman P. (1950). Method for the determination of amino acid sequence in peptides. *Acta Chemica Scandinavia* 4: 283-293.
- Edwards K.J., Bond P.L. und Banfield J.F. (2000). Characteristics of attachment and growth of *Thiobacillus caldus* on sulphide minerals: a chemotactic response to sulphur minerals? *Environmental Microbiology* 2: 324-332.
- Egelseer E., Schocher I., Sára M. und Sleytr U.B. (1995). The S-layer from *Bacillus stearothermophilus* DSM 2358 functions as an adhesion site for a high-molecular-weight amylase. *Journal of Bacteriology* 177: 1444-1451.
- Eichler J. (2003). Facing extremes: archaeal surface-layer (glyco)proteins. *Microbiology* 149: 3347-3351.
- Engelhardt H. (1988). Correlation averaging and 3-D reconstruction of 2-D crystalline membranes and macromolecules (Mayer F., ed.). *Methods of Microbiology* 20: 357-413.
- Engelhardt H., Gerbl-Rieger S., Santarius U. und Baumeister W. (1991). The three-dimensional structure of the regular surface protein of *Comamonas acidovorans* derived from native outer membranes and reconstituted two-dimensional crystals. *Molecular Microbiology* 5: 1695-1702.
- Engelhardt H. und Peters J. (1998). Structural research on surface layers: a focus on stability, surface layer homology, and surface layer-cell wall interactions. *Journal of Structural Biology* 124: 276-302.
- Engelhardt H. (2007a). Are S-layers exoskeletons? The basic function of protein surface layers revisited. *Journal of Structural Biology* 160: 115-124.
- Engelhardt H. (2007b). Mechanism of osmoprotection by archaeal S-layers: a theoretical study. *Journal of Structural Biology* 160: 190-199.
- Etzel K. (2008). Biological and abiotic dissolution of natural, cut and synthetic pyrite surfaces. Institut für Geowissenschaftlichen. Universität Kiel. Dissertation.
- Etzel K., Klingl A., Huber H., Rachel R., Schmalz G., Thomm M. und Depmeier W. (2008). Etching of {111} and {210} synthetic pyrite surfaces by two archaeal strains, *Metallosphaera sedula* and *Sulfolobus metallicus*. *Hydrometallurgy* 94: 116-120.
- Finn R.D., Mistry J., Tate J., Coggill P., Heger A., Pollington J.E., Gavin O.L., Gunasekaran P., Ceric G., Forslund K., Holm L., Sonnhammer E.L., Eddy S.R. und Bateman A. (2010) The Pfam protein families database. *Nucleic Acids Research* 38 (Suppl 1): D211-D222.
- Flemming H.-C. und Wingender J. (2010). The biofilm matrix. *Nature Reviews Microbiology* 8: 623-633.
- Fletcher C.M., Coyne M.J., Bentley D.L., Villa O.F. und Comstock L.E. (2007). Phase-variable expression of a family of glycoproteins imparts a dynamic surface to a symbiont in its human intestinal ecosystem. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 104: 2413-2418.

- Fowler T.A., Holmes P.R. und Crundwell F.K. (1999). Mechanism of pyrite dissolution in the presence of *Thiobacillus ferrooxidans*. *Applied Environmental Microbiology* 65: 2987-2993.
- Frece J., Kos B., Svetec I.K., Zgaga Z., Mrša V. und Šušković J. (2005). Importance of S-layer proteins in probiotic activity of *Lactobacillus acidophilus* M92. *Journal of Applied Microbiology* 98: 285-292.
- Freund J. und Petty J.T. (2007). Response of fish and macroinvertebrate bioassessment indices to water chemistry in a mined Appalachian watershed. *Environmental Management* 39: 707-720.
- Frisk A., Ison C.A. und Lagergård T. (1998). GroEL heat shock protein of *Haemophilus ducreyi*: association with cell surface and capacity to bind to eukaryotic cells. *Infection and Immunity* 66: 1252-1257.
- Fröls S., Ajon M., Wagner M., Teichmann D., Zolghadr B., Folea M., Boekema E.J., Driessen A.J., Schleper C. und Albers S.-V. (2008). UV-inducible cellular aggregation of the hyperthermophilic archaeon *Sulfolobus solfataricus* is mediated by pili formation. *Molecular Microbiology* 70: 938-952.
- Fuchs T., Huber H., Teiner K., Burggraf S. und Stetter K.O. (1995). *Metallosphaera prunae*, sp. nov., a novel metal-mobilizing, thermoacidophilic archaeum, isolated from a Uranium mine in Germany. *Systematic and Applied Microbiology* 18: 560-566.
- Fujimoto K. (1995). Freeze-fracture replica electron microscopy combined with SDS digestion for cytochemical labeling of integral membrane proteins. Application to the immunogold labeling of intercellular junctional complexes. *Journal of Cell Science* 108: 3443-3449.
- Garduno R., Phipps B.M. und Kay W.W. (1995). Physical and functional S-layer reconstitution in *Aeromonas salmonicida*. *Journal of Bacteriology* 177: 2684-2694.
- Gasteiger E., Hoogland C., Gattiker A., Duvaud S., Wilkins M.R., Appel R.D. und Bairoch A. (2005). Protein identification and analysis tools on the ExPASy server. In: *The Proteomics Protocols Handbook* (John M. Walker, ed.): 571-607. Humana Press.
- Gehrke T., Telegdi J., Thierry D. und Sand W. (1998). Importance of extracellular polymeric substances from *Thiobacillus ferrooxidans* for bioleaching. *Applied Environmental Microbiology* 64: 2743-2747.
- Goebel B.M. und Stackebrandt E. (1994). Cultural and phylogenetic analysis of mixed microbial populations found in natural and commercial bioleaching environments. *Applied Environmental Microbiology* 60: 1614-1621.
- Graham L.L., Harris R., Villiger W. und Beveridge T.J. (1991). Freeze-substitution of gram-negative eubacteria: general cell morphology and envelope profiles. *Journal of Bacteriology* 173: 1623-1633.
- Grogan D.W. (1989). Phenotypic characterization of the archaeobacterial genus *Sulfolobus*: comparison of five wild-type strains. *Journal of Bacteriology* 171: 6710-6719.
- Grogan D.W. (1996). Organization and interactions of cell envelope proteins of the extreme thermo-acidophile *Sulfolobus acidocaldarius*. *Canadian Journal of Microbiology* 42: 1163-1171.
- Gruber K. und Sleytr U.B. (1988). Localized insertion of new S-layer during growth of *Bacillus stearothermophilus* strain PV72. EMBO Workshop on crystalline bacterial surface layers. Springer, Berlin Heidelberg.
- Guiliani N. und Jerez C.A. (2000). Molecular cloning, sequencing, and expression of omp-40, the gene coding for the major outer membrane protein from acidophilic bacterium *Thiobacillus ferrooxidans*. *Applied and Environmental Microbiology* 66: 2318-2324.

- Gupta R und Brunak S. (2002). Prediction of glycosylation across the human proteome and correlation to protein function. *Pacific Symposium on Biocomputing* 7: 310-322.
- Hallberg K.B. und Lindström E.B. (1994). Characterization of *Thiobacillus caldus* sp. nov., a moderately thermophilic acidophile. *Microbiology* 140: 3451-3456.
- Hallberg K.B., Thomson H.E.C., Boeselt I. und Johnson D.B. (2001). Aerobic and anaerobic sulfur metabolism by acidophilic bacteria. In: Biohydrometallurgy: fundamentals, technology and sustainable development (Ciminelli V.S.T., Garcia O.Jr., eds.): 423-431. Elsevier, Amsterdam. The Netherlands.
- Hallberg K.B., González-Toril E. und Johnson D.B. (2010). *Acidithiobacillus ferrivorans*, sp. nov.; facultatively anaerobic, psychrotolerant iron- and sulfur-oxidizing acidophiles isolated from metal mine-impacted environments. *Extremophiles* 14: 9-19.
- Hamburger Z.A., Brown M.S., Isberg R.R. und Bjorkman P.J. (1999). Crystal structure of invasins: a bacterial integrin-binding protein. *Science* 286: 291-295.
- Harneit K., Göksel A., Kock D., Klock J.-H., Gehrke T. und Sand W. (2006). Adhesion to metal sulfide surfaces by cells of *Acidithiobacillus ferrooxidans*, *Acidithiobacillus thiooxidans* and *Leptospirillum ferrooxidans*. *Hydrometallurgy* 83: 245-254.
- Hassan A.N., Frank J.F. und Qvist K.B. (2002). Direct observation of bacterial exopolysaccharides in dairy products using confocal scanning laser microscopy. *Journal of Dairy Science* 85: 1705-1708.
- Hennequin C., Porcheray F., Waligora-Dupriet A.-J., Collignon A., Barc M.-C., Bourlioux P und Karjalainen T. (2001). GroEL (Hsp60) of *Clostridium difficile* is involved in cell adherence. *Microbiology* 147: 87-96.
- Henning U. (1975). Determination of cell shape in bacteria. *Annual Review of Microbiology* 29: 45-60.
- Henry C.M. (1972). Studies on the tetragonal self-assembling protein layer of *Bacillus brevis* P1. Universität Pittsburgh, USA. Dissertation.
- Hirokawa T. (1998). SOSUI: classification and secondary structure prediction system for membrane proteins. *Bioinformatics* 14: 378-379.
- Hobot J.A., Carlemalm E., Villiger W. und Kellenberger E. (1984). Periplasmic gel: new concept resulting from the reinvestigation of bacterial cell envelope ultrastructure by new methods. *Journal of Bacteriology* 160: 143-152.
- Hofte M. (1993). Classes of microbial siderophores. In: Iron Chelation in Plants and Soil Microorganisms (Barton L.L., Hemming B.C., eds.): p. 4. Academic Press, San Diego, CA, USA.
- Holst G.-J. van und Varner J.E. (1984). Reinforced polyproline II confirmation in a hydroxyproline-rich cell wall glycoprotein from carrot root. *Plant Physiology* 74: 247-251.
- Huber G., Huber H. und Stetter K.O. (1986). Isolation and characterization of new metal-mobilizing bacteria. *Biotechnology and Bioengineering Symposium* 16: 239-251.
- Huber G., Spinnler C., Gambacorta A. und Stetter K.O. (1989). *Metallosphaera sedula*, gen. and sp. nov. represents a new genus of aerobic, metal-mobilizing, thermoacidophilic archaeobacteria. *Systematic and Applied Microbiology* 12: 38-47.
- Huber G. und Stetter K.O. (1991). *Sulfolobus metallicus*, sp. nov., a novel strictly chemolitho-autotrophic thermophilic archaeal species of metal-mobilizers. *Systematic and Applied Microbiology* 14: 372-378.
- Huber H. (1987). Isolierung, Charakterisierung und taxonomische Einordnung neuer mesophiler, metallmetabolisierender Bakterien. Lehrstuhl Mikrobiologie, Universität Regensburg. Dissertation

- Huber H. und Stetter K.O. (1989). *Thiobacillus prosperus* sp. nov., represents a new group of halotolerant metal-metabolizing bacteria isolated from a marine geothermal field. *Archives of Microbiology* 151: 479-485.
- Huber H. und Stetter K.O. (1990). *Thiobacillus cuprinus* sp. nov., a novel facultatively organotrophic metal-mobilizing bacterium. *Applied Environmental Microbiology* 56: 315-322.
- Jarosch M., Egelseer E.M., Mattanovich D., Sleytr U.B. und Sára M. (2000). S-layer gene sbsC of *Bacillus stearothermophilus* ATCC 12980: molecular characterization and heterologous expression in *Escherichia coli*. *Microbiology* 146: 273-281.
- Jarrell K.F., Jones G.M. und Nair D.B. (2010). Biosynthesis and role of N-linked glycosylation in cell surface structures of archaea with a focus on flagella and S-layers. *International Journal of Microbiology* 2010.
- Jones R.A., Koval S.F. und Nesbitt H.W. (2003). Surface alteration of arsenopyrite (FeAsS) by *Thiobacillus ferrooxidans*. *Geochim chosmochim acta* 67: 955-965.
- Jonson A.B., Normark S. und Rhen M. (2005). Fimbriae, pili, flagella and bacterial virulence. *Contributions to Microbiology* 12: 67-89.
- Julenius K., Mølgaard A., Gupta R. und Brnak S. (2005). Prediction, conservation analysis, and structural characterization of mammalian mucin-type O-glycosylation sites. *Glycobiology* 15: 153-164.
- Junglas B. (2006). Die hyperthermophilen Archaeen *Ignicoccus* sp. KIN4/M und *Nanoarchaeum equitans*: Ultrastrukturelle und Immuncytochemische Untersuchungen an Ultradünnschnitten. Lehrstuhl Mikrobiologie, Universität Regensburg. Diplomarbeit.
- Käll L., Krogh A. und Sonnhammer E.L.L. (2004). A combined transmembrane topology and signal peptide prediction method. *Journal of Molecular Biology* 338: 1027-1036.
- Kanao T., Kamimura K. und Sugio T. (2007). Identification of a gene encoding a tetrathionat hydrolase in *Acidithiobacillus ferrooxidans*. *Journal of Biotechnology* 132: 16-22.
- Karas M., Bachmann D., Bahr U. und Hillenkamp F. (1987). Matrix-assisted ultraviolet laser desorption of non-volatile compounds. *International Journal of Mass Spectrometry and Ion Processes* 78: 53-68.
- Karas M. und Hillenkamp F. (1988). Laser desorption ionization of proteins with molecular masses exceeding 10,000 daltons. *Analytical Chemistry* 60: 2299-2301.
- Kelley L.A. und Sternberg M.J.E. (2009). Protein structure prediction on the web: a case study using the Phyre server. *Nature Protocols* 4: 363-371.
- Kelly D.P. und Wood A.P. (2000). Reclassification of some *Thiobacillus* to the newly designated genera *Acidithiobacillus* gen. nov., *Halothiobacillus* gen. nov. and *Thermithiobacillus* gen. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 50: 511-516.
- Kelly D.P., Uchino Y., Huber H., Amils R. und Wood A.P. (2007). Reassessment of the phylogenetic relationships of *Thiomonas cuprina*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 57: 2720-2724.
- Kennedy A., Cherry D. und Currie R. (2003). Field and laboratory assessment of a coal processing effluent in the Leading Creek Watershed, Meigs County, Ohio. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 44: 324-331.
- Kessel M., Wildhaber I., Cohen S. und Baumeister W. (1988). Three-dimensional structure of the regular surface glycoprotein layer of *Halobacterium volcanii* from the Dead Sea. *The EMBO Journal* 7: 1549-1554.

- Kilz S., Budzikiewicz und Waffenschmidt S. (2002). In-gel deglycosylation of sodiumdodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis-separated glycoproteins for carbohydrate estimation by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *Journal of Mass Spectrometry* 37: 331-335.
- Klingl A. (2007). Ultrastrukturelle Aspekte Pyrit-oxidierender Mikroorganismen. Lehrstuhl Mikrobiologie, Universität Regensburg. Diplomarbeit.
- König H., Rachel R. und Claus H. (2007). Proteinaceous surface layers of archaea: ultrastructure and biochemistry. In: *Archaea: Molecular Cell Biology* (Cavicchiolo R., ed.): pp. 315-340. ASM Press.
- Koerdt A., Gödeke J., Berger J., Thormann K.M. und Albers S.-V. (2010). Crenarchaeal biofilm formation under extreme conditions. *PLoS ONE* 5: e14104.
- Kolker E., Higdon R. und Hogan J.M. (2006). Protein identification and expression analysis using mass spectrometry. *Trends in Microbiology* 14: 229-235.
- Kondrat'eva T.F., Ageeva S.N., Muntyan L.N., Pivovarova T.A. und Karavaiko G.I. (2002). Strain polymorphism of the plasmid profiles in *Acidithiobacillus ferrooxidans*. *Microbiology* 71: 319-325.
- Kotiranta A.K., Hitoshi I., Haapasalo M.P.P. und Lounatmaa K. (1999). Radiation sensitivity of *Bacillus cereus* with and without a crystalline surface protein layer. *FEMS Microbiology Letters* 179: 275-280.
- Kremer J.M., Mastronarde D.N. und McIntosh J.R. (1996). Computer visualization of three-dimensional image data using IMOD. *Journal of Structural Biology* 116: 71-76.
- Krogh A., Larsson B., von Heijne G. und Sonnhammer E.L.L. (2001). Predicting transmembrane protein topology with a hidden markov model: application to complete genomes. *Journal of Molecular Biology* 305: 567-580.
- Laemmli U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685.
- Lapaglia C. und Hartzell P.L. (1997). Stress-induced production of biofilm in the hyperthermophile *Archeoglobus fulgidus*. *Applied Environmental Microbiology* 63: 3158-3163.
- Larsson L., Olsson G., Holst O. und Karlsson H.T. (1993). Oxidation of pyrite by *Acidianus brierleyi*: Importance of close contact between the pyrite and the microorganisms. *Biotechnology Letters* 15: 99-104.
- Laue H., Schenk A., Li H., Lambertsen L., Neu T.R., Molin S. und Ullrich M.S. (2006). Contribution of alginate and levan production to biofilm formation by *Pseudomonas syringae*. *Microbiology* 152: 2909-2918.
- Lazar P. (2004). Optimierung der Gewinnung von extrazellulären polymeren Substanzen von Laugungsbakterien. Universität Hamburg. Diplomarbeit.
- Leathen W., Braley Sr. S. und McIntyre L. (1953). The role of bacteria in the formation of acid from certain sulfuritic constituents associated with bituminous coal. I. *Thiobacillus thiooxidans*. *Applied Microbiology* 1: 61-64.
- Lembcke G., Dürr R., Hegerl R. und Baumeister W. (1991). Image analysis and processing of an imperfect two-dimensional crystal: the surface layer of the archaebacterium *Sulfolobus acidocaldarius* re-investigated. *Journal of Microscopy* 161: 263-278.
- Lembcke G., Baumeister W., Beckmann E. und Zemlin F. (1993). Cryoelectron microscopy of the surface protein of *Sulfolobus shibatae*. *Ultramicroscopy* 49: 397-406.
- Levicán G., Ugalde J.A., Ehrenfeld N., Maass A. und Parada P. (2008). Comparative genomic analysis of carbon and nitrogen assimilation mechanisms in three indigenous bioleaching bacteria: predictions and validations. *BMC Genomics* 9: 581.

- Li Y.-Q., Wan D.-S., Huang S.-S., Leng F.-F., Yan L., Ni Y.-Q. und Li H.-Y. (2010). Type IV pili of *Acidithiobacillus ferrooxidans* are necessary for sliding, twitching motility, and adherence. *Current Microbiology* 60: 17-24.
- Lovley D.R. und Phillips E.J.P. (1986). Organic matter mineralization with reduction of ferric iron in anaerobic sediments. *Applied and Environmental Microbiology* 51: 683-689.
- Ludwig W., Strunk O., Klugbauer N., Weizenegger M., Neumaier J., Bachleitner M. und Schleifer K.H. (1998). Bacterial phylogeny based on comparative sequence analysis. *Electrophoresis* 19: 554-568.
- Ludwig W., Strunk O., Westram R., Richter L., Meier H., Yedhukumar, Buchner A., Lai T., Steppi S., Jobb G., Förster W., Brettske I., Gerber S., Ginhart A.W., Gross O., Grumann S., Hermann S., Jost R., König A., Liss T., Lüßmann R., May M., Nonhoff B., Reichel B., Strehlow R., Stamatakis A., Stuckmann N., Vilbig A., Lenke M., Ludwig T., Bode A., Schleifer K.-H. (2004). ARB: a software environment for sequence data. *Nucleic Acids Research* 32: 1363-1371.
- Mangold S., Laxander M., Harneit K., Rohwerder T., Claus G. und Sand W. (2008). Visualization of *Acidithiobacillus ferrooxidans* biofilms on pyrite by atomic force and epifluorescence microscopy under various experimental conditions. *Hydrometallurgy* 94: 127-132.
- Malouf E. und Prater J. (1961). Role of bacteria in the alteration of sulfide minerals. *Journal of Metals* 13: 353-356.
- Mark S.S., Bergkvist M., Yang X., Teixeira L.M., Bhatnagar P., Angert E.R. und Batt C.A. (2006). Bionanofabrication of metallic and semiconductor nanoparticle arrays using S-layer protein lattices with different lateral spacings and geometries. *Langmuir* 22: 3763-3774.
- Mastrorarde D.N. (2006). Tomographic reconstruction with the IMOD software package. *Microscopy and Microanalysis* 12: 178-179.
- Matuschek M., Burchhardt G., Sahn K. und Bahl H. (1994). Pullulanase of *Thermoanaerobacterium thermosulphurigenes* EM1 (*Clostridium thermosulphurigenes*): molecular analysis of the gene, composite structure of the enzyme, and a common model for its attachment to the cell surface. *Journal of Bacteriology* 176: 3295-3302.
- Merroun M.L., Raff J., Rossberg A., Hennig C., Reich T. und Selenska-Pobell S. (2005). Complexation of uranium by cells and S-layer sheets of *Bacillus sphaericus* JG-A12. *Applied and Environmental Microbiology* 71: 5532-5543.
- Mesnager S., Fontaine T., Mignot T., Delepierre M., Mock M. und Fouet A. (2000). Bacterial SLH domain proteins are non-covalently anchored to the cell surface via a conserved mechanism involving wall polysaccharide pyruvylation. *The EMBO Journal* 19: 4473-4484.
- Messner P. (2004). Prokaryotic glycoproteins: unexplored but important. *Journal of Bacteriology* 186: 2517-2519.
- Messner P., Pum D., Sára M., Stetter K.O. und Sleytr U.B. (1986). Ultrastructure of the cell envelope of the archaebacteria *Thermoproteus tenax* and *Thermoproteus neutrophilus*. *Journal of Bacteriology* 166: 1046-1054.
- Messner P. und Schäffer C. (2000). Surface layer glycoproteins of bacteria and archaea. In: Glycomicrobiology (Doyle R.J., ed.): 93-125. Kluwer Academic Publisher, New York, USA.
- Messner P. und Schäffer C. (2003). Prokaryotic glycoproteins. *Progress in the Chemistry of Organic Natural Products* 85: 51-124.

- Mielke R.E., Pace D.L., Porter T. und Southam G. (2003). A critical stage in the formation of acid mine drainage: colonization of pyrite by *Acidithiobacillus ferrooxidans* under pH-neutral conditions. *Geobiology* 1: 81-90.
- Mikkelsen D., Kappler U., Webb R.I., Rasch R., McEwan A.G. und Sly L.I. (2007). Visualization of pyrite leaching by selected thermophilic archaea: nature of microorganism-ore interactions during bioleaching. *Hydrometallurgy* 88: 143-153.
- Mjoli N. und Kulpa C.F. (1988). Identification of a unique outer membrane protein required for iron oxidation in *Thiobacillus ferrooxidans*. In: Biohydrometallurgy - Proceedings of the International Symposium Warwick 1987 (P. R. Norris und D. P. Kelly, eds.): pp. 89-103. Science and Technology Letters. Antony Rowe Ltd., Kew, Great Britain.
- Mohr V. und Larsen H. (1963). On the structural transformations and lysis of *Halobacterium salinarum* in hypotonic and isotonic solutions. *Journal of General Microbiology* 31: 267-280.
- Moraes T.F., Bains M., Hancock R.E. und Strynadka N.C. (2007). An arginine ladder in OprP mediates phosphate-specific transfer across the outer membrane. *Nature Structural and Molecular Biology* 14: 85-87.
- Moreira D. und Amils R. (1997). Phylogeny of *Thiobacillus cuprinus* and other mixotrophic thiobacilli: proposal for *Thiomonas* gen. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 47: 522-528.
- Mullis K.B. und Faloona F.A. (1987). Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods in Enzymology* 155: 335-350.
- Näther D. (2007). Untersuchung der Flagellen von *Pyrococcus furiosus*. Lehrstuhl Mikrobiologie, Universität Regensburg. Dissertation.
- Näther D.J., Rachel R., Wanner G. und Wirth R. (2006). Flagella of *Pyrococcus furiosus*: multifunctional organelles, made for swimming, adhesion to various surfaces, and cell-cell contacts. *Journal of Bacteriology* 188: 6915-6923.
- Nathanson A. (1902). Über eine Gruppe von Schwefelbakterien und ihren Stoffwechsel. *Mitteilungen aus dem Zoologischen Staatsinstitut Neapel* 15: 655-680.
- Ndlovu S. und Monhemius A.J. (2005). The influence of crystal orientation on the bacterial dissolution of pyrite. *Hydrometallurgy* 78: 187-197.
- Nemati M. und Harrison S.T.L. (2000). Effect of solid loading on thermophilic bioleaching of sulfide minerals. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology* 75: 526-532.
- Neuhoff V., Arold N., Taube D. und Erhardt W. (1988). Improved staining of proteins in polyacrylamide gels including isoelectric focusing gels with clear background at nanogram sensitivity using Coomassie Brilliant Blue G-250 and R-250. *Electrophoresis* 9: 255-262.
- Nickell S., Hegerl R., Baumeister W. und Rachel R. (2003). *Pyrodictium cannulae* enter the periplasmic space but do not enter the cytoplasm, as revealed by cryo-electron tomography. *Journal of Structural Biology* 141: 34-42.
- Norris P.R., Murrel J.C. und Hinson D. (1995). The potential for diazotrophy in iron- and sulfur-oxidizing acidophilic bacteria. *Archives of Microbiology* 164: 294-300.
- Norris P.R., Burton N.P. und Foulis N.A.M. (2000). Acidophiles in bioreactor mineral processing. *Extremophiles* 4: 71-76.
- Ohmura N., Sasaki K., Matsumoto N. und Saiki H. (2002). Anaerobic respiration using Fe<sup>3+</sup>, S<sup>0</sup>, and H<sub>2</sub> in the chemolithoautotrophic bacterium *Acidithiobacillus ferrooxidans*. *Journal of Bacteriology* 184: 2081-2087.
- Osborn M.J. und Rothfield L. (2007). Cell shape determination in *Escherichia coli*. *Current Opinion in Microbiology* 10: 606-610.

- Pallen M.J. und Matzke N.J. (2006). From The Origin of Species to the origin of bacterial flagella. *Nature Reviews Microbiology* 4: 784-790.
- Pantzar M., Teneberg S und Lagergård T. (2006). Binding of *Haemophilus ducreyi* to carbohydrate receptors is mediated by the 58.5-kDa GroEL heat shock protein. *Microbes and Infection* 8: 2452-2458.
- Papadopoulos J.S. und Agarwala R. (2007). COBALT: constraint-based alignment tool for multiple protein sequences. *Bioinformatics* 23: 1073-1079.
- Papayannopoulos I.A. (1995). The interpretation of collision-induced dissociation tandem mass-spectra of peptides. *Mass Spectrometry Reviews* 14: 49-73.
- Paula S.J., Duffey P.S., Abott S.L., Kokka R.P., Osihiro L.S., Janda J.M., Shimada T. und Sakazaki R. (1988). Surface properties of autoagglutinating mesophilic aeromonads. *Infection and Immunity* 56: 2658-2665.
- Peters J., Nitsch M., Kuhlmoorgen B., Golbik R., Lupas A., Kellermann J., Engelhardt H., Pfander J.P., Müller S., Goldie K., Engel A., Stetter K.O. und Baumeister W. (1995). Tetrabrachion: a filamentous archaeobacterial surface protein assembly of unusual structure and extreme stability. *Journal of Molecular Biology* 245: 385-401.
- Peters J., Baumeister W. und Lupas A. (1996). Hyperthermostable surface layer protein tetrabrachion from the archaeobacterium *Staphylothermus marinus*: evidence for the presence of a right-handed coiled coil derived from the primary structure. *Journal of Molecular Biology* 257: 1031-1041.
- Peyfoon E., Meyer B., Hitchen P.G., Panico M., Morris H.R., Haslam S.M., Albers S.-V. und Dell A. (2010). The S-layer glycoprotein of the crenarchaeote *Sulfolobus acidocaldarius* is glycosylated at multiple sites with chitobiose-linked N-glycans. *Archaea* 2010.
- Phipps B.M., Engelhardt H., Huber R. und Baumeister W. (1990). 3-Dimensional structure of the crystalline protein envelope layer of the hyperthermophilic archaeobacterium *Pyrobaculum islandicum*. *Journal of Structural Biology* 103: 152-163.
- Pley U., Schipka J., Gambacorta A., Jannasch H.W., Fricke H., Rachel R. und Stetter K.O. (1991). *Pyrodictium abyssi* sp. nov. represents a novel heterotrophic marine archaeal hyperthermophile growing at 110 °C. *Systematic and Applied Microbiology* 14: 245-253.
- Pollmann K., Raff J., Merroun M., Fahmy K. und Selenska-Pobell S. (2006). Metal binding by bacteria from uranium mining waste piles and its technological applications. *Biotechnology Advances* 24: 58-68.
- Prüschenk R. und Baumeister W. (1987). Three-dimensional structure of the surface protein of *Sulfolobus solfataricus*. *European Journal of Cell Biology* 45: 185-191.
- Prüschenk R., Baumeister W. und Zillig W. (1987). Structure variants in different species of *Sulfolobus*. *FEMS Microbiology Letters* 43: 327-330.
- Pum D., Messner P. und Sleytr U.B. (1991). Role of the S-layer in morphogenesis and cell division of the archaeobacterium *Methanococcus sinense*. *Journal of Bacteriology* 173: 6865-6873.
- Rachel R. (1999). Fine structure of hyperthermophilic prokaryotes. In: *Enigmatic Microorganisms and Life in Extreme Environments* (Seckbach J., ed.): 277-289. Kluwer Academic Publisher. The Netherlands.
- Rachel R., Engel A.M., Huber R., Stetter K.O. und Baumeister W. (1990). A porin-type protein is the main constituent of the cell envelope of the ancestral eubacterium *Thermotoga maritima*. *FEBS Letters* 262: 64-68.

- Rachel R., Pum D., Šmarda J., Šmajš D., Komrska J., Krzyžánek V., Rieger G. und Stetter K.O. (1997). II. Fine Structure of S-layers. *FEMS Microbiology Reviews* 20: 13-23.
- Rachel R., Meyer C., Klingl A., Gürster S., Heimerl T., Wasserburger N., Burghardt T., Küper U., Bellack A., Schopf S., Wirth R., Huber H. und Wanner G. (2010). Analysis of the ultrastructure of archaea by electron microscopy. *Methods in Cell Biology* 96: 47-69.
- Rawlings D.E. (2001). The molecular genetics of *Thiobacillus ferrooxidans* and other mesophilic, acidophilic, chemolithotrophic, iron- or sulfur-oxidizing bacteria. *Hydrometallurgy* 59: 187-201.
- Rawlings D.E. (2005). Characteristics and adaptability of iron- and sulfur-oxidizing microorganisms used for the recovery of metals from minerals and their concentrates. *Microbial Cell Factories* 4: 13.
- Razzell W. und Trussell P. (1963). Isolation and properties of an iron-oxidizing *Thiobacillus*. *Journal of Bacteriology* 85: 595-603.
- Reimer L. und Kohl H. (2009). Chapter 10: Elemental analysis by X-ray and electron energy-loss spectroscopy. In: Transmission Electron Microscopy. 5th Revised edition: 419-439. Springer, New York, USA.
- Riedel E. (2004). Anorganische Chemie. 6. Auflage. Walter de Gruyter, Berlin, New York 2004.
- Ristl R., Steiner K., Zarschler K., Zayni S., Messner P. und Schäffer C. (2011). The S-layer glycome – adding to the sugar coat of bacteria. *International Journal of Microbiology* 2011.
- Rodrigues D.F. und Elimelech M. (2009). Role of type 1 fimbriae and mannose in the development of *Escherichia coli* K12 biofilm: from initial cell adhesion to biofilm formation. *Biofouling* 25: 401-411.
- Rohwerder T., Gehrke T., Kinzler K. und Sand W. (2003). Bioleaching review part A: Progress in bioleaching: fundamentals and mechanisms of bacterial metal sulfide oxidation. *Applied Microbiology and Biotechnology* 63: 239-248.
- Rose A.L. und Waite T.D. (2003). Kinetics of iron complexation by dissolved natural organic matter in coastal waters. *Marine Chemistry* 84: 85-103.
- Rose R.W., Bruser T., Kissinger J.C. und Pohlschröder M. (2002). Adaption of protein secretion to extremely high-salt conditions by extensive use of the twin arginine translocation pathway. *Molecular Microbiology* 45: 943-950.
- Rudolfs W. (1922). Oxidation of iron pyrites by sulfur-oxidizing organisms and their use for making mineral phosphates available. *Soil Science* 14: 135-147.
- Rzhepishevskaya O.I., Valdés J., Marcinkeviciene L., Gallardo C.A., Meskys R., Bonnefoy V., Holmes D.S. und Dopson M. (2007). Regulation of a novel *Acidithiobacillus caldus* gene cluster involved in metabolism of reduced inorganic sulfur compounds. *Applied and Environmental Microbiology* 73: 7367-7372.
- Saiki R.K., Scharf S.J., Faloona S.J., Mullis K.B., Horn G.T., Erlich H.A. und Arnheim N. (1985). Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* 230: 1350-1354.
- Saiki R.K., Gelfand D.H., Stoffel S., Scharf S.J., Higuchi R., Horn G.T., Mullis K.B. und Erlich H.A. (1988). Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 239: 487-491.
- Sand W. und Gehrke T. (2006). Extracellular polymeric substances mediate bioleaching/biocorrosion via interfacial processes involving iron(III) ions and acidophilic bacteria. *Research in Microbiology* 157: 49-56.

- Sand W., Florian B. und Noël N. (2009). Mechanisms of bioleaching and the visualization of these by combined AFM & EFM. *Advanced Materials Research* 71-73: 297-302.
- Sano D., Wada K., Imai T., Masago Y. und Omura T. (2010). Norovirus-binding proteins recovered from activated sludge micro-organisms with an affinity to a noroviral capsid peptide. *Journal of Applied Microbiology* 109: 1923-1928.
- Sára M. und Sleytr U.B. (2000). S-layer proteins. *Journal of Bacteriology* 182: 859-868.
- Saxton W.O., Baumeister W. und Hahn M. (1984). Three-dimensional reconstruction of imperfect two-dimensional crystals. *Ultramicroscopy* 13: 57-70.
- Saxton W.O. (1996). Semper: Distortion compensation, selective averaging, 3-D reconstruction and transfer function correction in a highly programmable system. *Journal of Structural Biology* 116: 230-236.
- Schäffer C. und Messner P. (2001). Glycobiology of surface layer proteins. *Biochimie* 83: 591-599.
- Schäffer C., Wugeditsch T., Kählig H., Scheberl A., Zayni S. und Messner P. (2002). The surface layer (s-layer) glycoprotein of *Geobacillus stearothermophilus* NRS 2004/3a. *Journal of Biological Chemistry* 277: 6230-6239.
- Schägger H. und von Jagow G. (1987): Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range of 1 to 100 kDa. *Analytical Biochemistry* 166: 223-231.
- Schelert J., Dixit V., Hoang V., Simbahan J., Drozda M. and Blum P. (2004). Occurrence and characterization of mercury resistance in the hyperthermophilic archaeon *Sulfolobus solfataricus* by use of gene disruption. *Journal of Bacteriology* 186: 427-437.
- Schippers A. und Sand W. (1999). Bacterial leaching of metal sulfides proceeds by two indirect mechanisms via thiosulfate or via polysulfides and sulfur. *Applied and Environmental Microbiology* 65: 319-321.
- Schirmer T. (1998). General and specific porins from bacterial outer membranes. *Journal of Structural Biology* 121: 101-109.
- Scholz H.C., Riedmann E., Witte A., Lubitz W. und Kuen B. (2001). S-layer variation in *Bacillus stearothermophilus* PV72 is based on DNA rearrangements between the chromosome and the naturally occurring megaplasmids. *Journal of Bacteriology* 183: 1672-1679.
- Schopf S., Wanner G., Rachel R. und Wirth R. (2008). An archaeal bi-species biofilm formed by *Pyrococcus furiosus* and *Methanopyrus kandleri*. *Archives of Microbiology* 190: 371-377.
- Segrest J.P. und Jackson R.L. (1972). Molecular weight determination of glycoproteins by polyacrylamide gel electrophoresis in sodium dodecyl sulphate. *Methods in Enzymology* 28: 54-63.
- Semenza M., Viera M., Curutchet G. und Donati E. (2002). The role of *Acidithiobacillus caldus* in bioleaching of metal sulfides. *Latin American Applied Research* 32: 303-306.
- Sharma M. und Luthra-Guptasarma M. (2009). Degradation of proteins upon storage at near-neutral pH: Indications of a proteolytic/gelatinolytic activity associated with aggregates. *Biochimica et Biophysica Acta* 1790: 1282-1294.
- Sharma P.K., Das A., Hanumantha Rao K. und Forssberg K.S.E. (2003). Surface characterization of *Acidithiobacillus ferrooxidans* cells grown under different conditions. *Hydrometallurgy* 71: 285-292.

- Shears G.E., Ledward D.A. und Neale R.J. (1987). Iron complexation to carboxyl groups in a bovine serum albumin digest. *International Journal of Food Science and Technology* 22: 265-272.
- Shiomi D., Sakai M. und Niki H. (2008). Determination of bacterial rod shape by a novel cytoskeletal membrane protein. *The EMBO Journal* 27: 3081-3091.
- Shiomi D., Mori H. und Niki H. (2009). Genetic mechanism regulating bacterial cell shape and metabolism. *Communicative and Integrative Biology* 2: 219-220.
- Silverman M.P. und Lundgren D.G. (1959). Studies on the chemoautotrophic iron bacterium *Ferrobacillus ferrooxidans*. *Journal of Bacteriology* 78: 326-331.
- Silverman M., Rogoff M. und Wender I. (1961). Bacterial oxidation of pyrite materials in coal. *Applied Microbiology* 9: 491-496.
- Sleytr U.B., Messner P., Pum D. und Sára M. (1988). Crystalline bacterial cell surface layers. Proceedings of EMBO Workshop on crystalline bacterial surface layers. Springer Verlag, Berlin, Heidelberg.
- Sleytr U.B., Huber C., Ilk N., Pum D., Schuster B. und Egelseer E.M. (2007). S-layers as a tool kit for nanobiotechnical applications. *FEMS Microbiological Letters* 267: 131-144.
- Soucek D., Cherry D., Currie R., Latimer H. und Trent G. (2000). Laboratory to field validation in an integrative assessment of an acid mine drainage-impacted watershed. *Environmental Toxicology and Chemistry* 19: 1036-1043.
- Stone K., LoPresti M., Crawford M., DeAngelis R. und Williams K. (1989). Enzymatic digestion of proteins and HPLC peptide isolation. In: A practical guide to protein and peptide purification for microsequencing (Matsudaira P., ed.). Academic Press Inc.
- Sumper M., Berg E., Mengele R. und Strobel I. (1990). Primary structure and glycosylation of the S-layer protein of *Haloferax volcanii*. *Journal of Bacteriology* 172: 7111-7118.
- Szabó Z., Stahl A.O., Albers S.-V., Kissinger J.C., Driessen A.J.M. und Pohlschröder M. (2007a). Identification of diverse archaeal proteins with class III signal peptides cleaved by distinct archaeal prepilin peptidases. *Journal of Bacteriology* 189: 772-778.
- Szabó Z., Sani M., Groeneveld M., Zolghadr B., Schelert J., Albers S.-V., Blum P., Boekema E.J. und Driessen A.J. (2007b). Flagellar motility and structure in the hyperthermoacidophilic archaeon *Sulfolobus solfataricus*. *Journal of Bacteriology* 189: 4305-4309.
- Takai M., Kamimura K. und Sugio T. (2001). A new iron oxidase from a moderately thermophilic iron oxidizing bacterium strain TI-1. *European Journal of Biochemistry* 268: 1653-1658.
- Tanaka K., Waki H., Ido Y., Akita S., Yoshida Y. und Yoshida T. (1988). Protein and polymer analyses up to m/z 100,000 by laser ionization time-of-flight mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 2: 151-153.
- Taylor K.A., Deatherage F.J. und Amos L.A. (1982). Structure of the S-layer of *Sulfolobus acidocaldarius*. *Nature* 299: 840-842.
- Taylor E.S. und Lower S.K. (2008). Thickness and surface density of extracellular polymers on *Acidithiobacillus ferrooxidans*. *Applied and Environmental Microbiology* 74: 309-311.
- Teiner K. (1995). Die Ultrastruktur eines neuen Isolates der Sulfolobales (*Metallosphaera prunae*) in Abhängigkeit unterschiedlicher Substrate und Anheftung an Pyrit. Lehrstuhl Mikrobiologie, Universität Regensburg. Diplomarbeit.
- Temple K. und Colmer A. (1951). The autotrophic oxidation of iron by a new bacterium – *Thiobacillus ferrooxidans*. *Journal of Bacteriology* 62: 605-611.

- Temple K. und Delchamps E. (1953). Autotrophic bacteria and the formation of acid in bituminous coal mines. *Applied Microbiology* 1: 255-258.
- Tillet D. und Neilan B.A. (2000). Xanthogenate acid isolation from cultured and environmental cyanobacteria. *Journal of Phycology* 36: 251-258.
- Toba T., Virkola R., Westerlund B., Björkman Y., Sillanpää J., Vartio T., Kalkkinen N. und Korhonen T.K. (1995). A collagen-binding S-layer protein in *Lactobacillus crispatus*. *Applied Environmental Microbiology* 61: 2467-2471.
- Towbin H., Staehelin T. und Gordon J. (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: Procedure and some applications. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 76: 4350-4354.
- Tsuneda S., Aikawa H., Hayashi H., Yuasa A. und Hirata A. (2003). Extracellular polymeric substances responsible for bacterial adhesion onto solid surface. *FEMS Microbiology Letters* 223: 287-292.
- Valdés J., Pedroso I., Quatrini R., Dodson R.J., Tettelin H., Blake R. II., Eisen J.A. and Holmes D.S. (2008). *Acidithiobacillus ferrooxidans* metabolism: from genome sequence to industrial applications. *BMC Genomics* 9: 597.
- Valdés J., Quatrini R., Hallberg K., Dopson M., Valenzuela P.D.T. und Holmes D.S. (2009). Draft genome sequence of the extremely acidophilic bacterium *Acidithiobacillus caldus* ATCC 51756 reveals metabolic versatility in the genus *Acidithiobacillus*. *Journal of Bacteriology* 191: 5877-5878.
- Veith A. (2006). Untersuchungen von S-Layer Proteinen aus *Acidianus ambivalens*: Proteinisolierung, Nukleinsäuresequenzierung und heterologe Expression des Gens. Fachbereich Biologie, Technische Universität Darmstadt. Diplomarbeit.
- Veith A., Klingl A., Zolghadr B., Lauber K., Mentele R., Lottspeich F., Rachel R., Alber S.-V. und Kletzin A. (2009). *Acidianus*, *Sulfolobus* and *Metallosphaera* surface layers: structure, composition and gene expression. *Molecular Microbiology* 73: 58-72.
- Vu B., Chen M., Crawford R.J. und Ivanova E.P. (2009). Bacterial extracellular polysaccharides involved in biofilm formation. *Molecules* 14: 2535-2554.
- Waksman S. und Jaffe J. (1921). Acid production by a new sulfur-oxidizing bacterium. *Science* 53: 216.
- Waksman S. und Jaffe J. (1922). Microorganisms concerned in the oxidation of sulphur in the soil. II. *Thiobacillus thiooxidans*, a new sulphur-oxidizing organism isolated from the soil. *Journal of Bacteriology* 7: 239-256.
- Walter R.L., Ealick S.E., Friedman A.M., Blake R.C. II., Proctor R. und Shoham M. (1996). Multiple wavelength anomalous diffraction (MAD) crystal structure of rusticyanin: a highly oxidizing cupredoxin with extreme acid stability. *Journal of Molecular Biology* 263: 730-751.
- Walther P. und Ziegler A. (2002). Freeze substitution of high-pressure frozen samples: the visibility of biological membranes is improved when the substitution medium contains water. *Journal of Microscopy* 208: 3-10.
- Wang Y., Address K.J., Chen J., Geer L.Y., He J., He S., Lu S., Madej T., Marchler-Bauer A., Thiessen P.A., Zhang N. und Bryant S.H. (2007). MMDB: annotating protein sequences with Entrez's 3D-structure database. *Nucleic Acids Research* 35: 298-300.
- Watnick P. und Kolter R. (1999). Steps in the development of a *Vibrio cholerae* El Tor biofilm. *Molecular Microbiology* 34: 586-595.
- Watnick P. und Kolter R. (2000). Biofilm, city of microbes. *Journal of Bacteriology* 182: 2675-2679.

- Wildhaber I. und Baumeister W. (1987). The cell envelope of *Thermoproteus tenax*: three-dimensional structure of the surface layer and its role in shape maintenance. *The EMBO Journal* 6: 1475-1480.
- Winterbourn M., McDuffett W. und Eppley S. (2000). Aluminium and iron burdens of aquatic biota in New Zealand streams contaminated by acid mine drainage: effects of trophic level. *Science of the Total Environment* 254: 45-54.
- Witter A.E., Hutchins D.A., Butler A. und Luther III G.W. (2000). Determination of conditional stability constants and kinetic constants for strong model Fe-binding ligands in seawater. *Marine Chemistry* 69: 1-17.
- Wolf Y.I., Rogozin I.B., Grishin N.V. und Koonin E.V. (2002) Genome trees and the tree of life. *Trends in Genetics* 18: 472-479.
- Wu D., Hugenholtz P., Mavromatis K., Pukall R., Dalin E., Ivanova N.N., Kunin V., Goodwin L., Wu M., Tindall B.J., Hooper S.D., Pati A., Lykidis A., Spring S., Anderson I.J., D'haeseleer P., Zemla A., Singer M., Lapidus A., Nolan M., Copeland A., Han C., Chen F., Cheng J.F., Lucas S., Kerfeld C., Lang E., Gronow S., Chain P., Bruce D., Rubin E.M., Kyrpides N.C., Klenk H.P. und Eisen J.A. (2009) A phylogeny-driven genomic encyclopaedia of Aacteria and Archaea. *Nature* 462: 1056-1060.
- Yarza P., Richter M., Peplies J., Euzéby J., Amann R., Schleifer K.-H., Ludwig W., Glöckner F.O., Rosselló-Móra R. (2008). The all-species living tree project: a 16S rRNA-based phylogenetic tree of all sequenced type strains. *Systematic and Applied Microbiology* 31: 241-250.
- Yu N.Y., Wagner J.R., Laird M.R., Melli G., Rey S., Lo R., Dao P., Sahinalp S.C., Ester M., Foster L.J. und Brinkman F.S.L. (2010). PSORTb 3.0: improved protein subcellular localization prediction with refined localization subcategories and predictive capabilities for all prokaryotes. *Bioinformatics* 26: 1608-1615.
- Zellner G., Stackebrandt E., Kneifel H., Messner P., Sleytr U.B., Conway de Macario E., Zabel H.-P, Stetter K.O. und Winter J. (1989). Isolation and characterization of a thermophilic, sulfate reducing archaebacterium, *Archaeoglobus fulgidus* strain Z. *Systematic and Applied Microbiology* 11: 151-160.
- Zhou Q.G., Bo F., Hong Bo Z., Xi L., Jian G., Fei Fei L und Xin Hua C. (2007). Isolation of *Acidithiobacillus caldus* and its role in bioleaching of chalcopyrite. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 23: 1217-1225.
- Zillig W., Stetter K.O., Wunderl S., Schulz W., Priess H. und Scholz J. (1980). The *Sulfolobus*-„*Caldariella*“ group: taxonomy on the basis of the structure of DNA-dependent RNA polymerases. *Archives of Microbiology* 125: 259-269.
- Zipper C.E. und Skousen J.G. (2010). Influent water quality affects performance of passive treatment systems for acid mine drainage. *Mine Water and the Environment* 29: 135-143.
- Zolghadr B., Klingl A., Koerdt A., Driessen A.J.M., Rachel R. und Albers S.-V. (2010). Appendage-mediated surface adherence of *Sulfolobus solfataricus*. *Journal of Bacteriology* 192: 104-110.
- Zyl L.J. van, Deane S.M., Louw L.-A. und Rawlings D.W. (2008). Presence of a family of plasmids (29 to 65 kilobases) with a 26-kilobase common region in different strains of the sulfur-oxidizing bacterium *Acidithiobacillus caldus*. *Applied and Environmental Microbiology* 74: 4300-4308.





---

## **Ehrenwörtliche Erklärung**

Ich versichere, dass ich diese Arbeit selbstständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel benützt habe.

Regensburg, Januar 2011



---

# Curriculum Vitae

## Persönliche Daten

Name: Andreas Klingl  
geboren am: 24.07.1981 in Deggendorf  
Familienstand: ledig  
Nationalität: deutsch

## Schulbildung

---

09/1987 – 07/1991      Grundschule Prackenbach/Moosbach  
09/1991 – 07/2000      Dominicus-von-Linprun Gymnasium, Viechtach (Bayern)  
Abschluss: allgemeine Hochschulreife

## Hochschulbildung

### Universität Regensburg

---

01/2001 – 03/2007      Studium der Biologie (Diplom)  
Diplomarbeit bei PD Dr. Reinhard Rachel, Lehrstuhl für  
Mikrobiologie und Zentrum für Elektronenmikroskopie:  
„Ultrastrukturelle Aspekte Pyrit-oxidierender Mikroorganismen“

## Promotion

### Universität Regensburg

---

Seit 04/2007              Promotion bei PD Dr. Reinhard Rachel, Lehrstuhl für Mikrobiologie  
und Zentrum für Elektronenmikroskopie:  
„**Struktur und Funktion von S-Layern acidophiler Bakterien  
und Archaeen, ihre Rolle bei der Pyrit-Oxidation sowie die  
Adhäsion an Oberflächen**“

---

## IX Publikationen

Etzel K., Klingl A., Huber H., Rachel R., Schmalz G., Thomm M. und Depmeier W. (2008) Etching of {111} and {210} synthetic pyrite surfaces by two archaeal strains, *Metallosphaera sedula* and *Sulfolobus metallicus*. *Hydrometallurgy* 94: 116-120.

Veith A., Klingl A., Zolghadr B., Lauber K., Mentele R., Lottspeich F., Rachel R., Albers S.V. und Kletzin A. (2009) *Acidianus*, *Sulfolobus* and *Metallosphaera* Surface Layers: Structure, Composition and Gene Expression. *Molecular Microbiology* 73: 58-72.

Zolghadr B., Klingl A., Koerdts A., Driessen A.J.M., Rachel R. und Albers S.-V. (2010) Appendage-Mediated Surface Adherence of *Sulfolobus solfataricus*. *Journal of Bacteriology* 192: 104-110.

Loibl M., Grossmann G., Stradalova V., Klingl A., Rachel R., Tanner W., Malinsky J., und Opekarová M. (2010) C-terminus of Nce102 determines the structure and function of microdomains in the *Saccharomyces cerevisiae* plasma membrane. *Eukaryotic Cell* 9: 1184-1192.

Rachel R., Meyer C., Klingl A., Gürster S., Heimerl T., Wasserburger N., Burghardt T., Kueper U., Bellack A., Schopf S., Wirth R., Huber H. und Wanner G. (2010) Analysis of the Ultrastructure of Archaea by Electron Microscopy. *Methods in Cell Biology* 96: 47-69.

Zolghadr B., Klingl A., Rachel R., Driessen A.J.M., und Albers S.-V. (2011). The bindosome is a structural component of the *Sulfolobus solfataricus* cell envelope. *Extremophiles* 15.

Klingl A., Moissl-Eichinger C., Wanner G., Zweck J., Huber H., Thomm M. und Rachel R. (2011) Analysis of the surface proteins of *Acidithiobacillus ferrooxidans* strain SP5/1 and the new, pyrite-oxidizing *Acidithiobacillus* isolate HV2/2, and their possible involvement in pyrite oxidation. *Archives of Microbiology*. *Submitted*.