

**Nachweis neuartiger Wirts-Parasiten-Systeme bei
hyperthermophilen Archaeen sowie Genomanalyse
und molekularbiologische Untersuchungen von**
Nanoarchaeum equitans



Dissertation

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

vorgelegt von

Michael Hohn

aus Garmisch-Partenkirchen

Regensburg, 2003

Diese Arbeit wurde angeleitet von Prof. Dr. K.O. Stetter

Promotionsgesuch eingereicht am: 26. November 2003

Tag der mündlichen Prüfung: 08. März 2004

Prüfungsausschuß:	Vorsitzender:	Prof. Dr. R. Wirth
	1. Gutachter:	Prof. Dr. K.O. Stetter
	2. Gutachter:	Prof. Dr. W. Tanner
	3. Prüfer:	Prof. Dr. S. Schneuwly

NANOARCHAEUM EQUITANS

To some the dance of angels on a pin
Excites the mind when darkness casts a pall,
While others search the darkness for a kin,
A carrier of truth befitting all.

Before we ever were, conceived of pain,
Of truth or beauty, love, of gods and all
We treasure as our human virtue, gain,
These now the smallest of us found their call.

The mind would often rather follow trails
That lead to easy answers, Satan, sin,
And definitions found in ancient tales
Of paranoia sanctified as spin.
And all the while N. Equitans unknown
Prevailed indifferent to all we've grown.

William Brendan McPhillips

May 17, 2002

Inhaltsverzeichnis

I.	EINLEITUNG	1
II.	MATERIAL UND METHODEN	6
1.	Bezugsquellen von Substanzen	6
1.1.	Chemikalien	6
1.2.	Enzyme, Vektoren und Reaktionskits	7
1.3.	Organismen und 16S rRNA Klonsequenzen.....	8
1.4.	Oligonukleotidprimer und –sonden.....	9
2.	Medien und Substrate	10
2.1.	Medien	10
2.1.1.	LB-Medium.....	10
2.1.2.	½SME-Medium; modifiziert nach Huber.....	10
2.1.3.	Allen-Medium; modifiziert nach Brock	11
2.2.	Herstellung der Kulturmedien.....	12
2.2.1.	Aerobe Medien.....	12
2.2.2.	Anaerobe Medien	12
2.3.	Substrate.....	12
3.	Sterilisation	12
4.	Verwendete Organismen und deren Kultivierung.....	13
4.1.	Routinemäßige Kultivierung.....	13
4.2.	Kultivierung im Großmaßstab.....	13
4.3.	Aufreinigung von <i>N. equitans</i> -Zellmassen durch differenzielle Zentrifugation	14
5.	Mikroskopie	15
5.1.	Phasenkontrast- und Fluoreszenzmikroskopie	15
5.2.	Bestimmung von Zellzahlen	15
6.	Molekulargenetische Methoden	16
6.1.	Reinigung und Analyse von DNA	16
6.1.1.	DNA-Isolierung.....	16
6.1.1.1.	Puffer und Lösungen.....	16
6.1.1.2.	DNA-Isolierung aus Flüssigkulturen	17
6.1.1.3.	DNA-Isolierung aus Umweltproben	18
6.1.2.	Quantifizierung von DNA	19
6.1.2.1.	Konzentrationsbestimmung auf Ethidiumbromidplatten	19
6.1.2.2.	Photometrische Konzentrationsbestimmung.....	19

6.1.3.	Agarosegelelektrophorese	20
6.1.3.1.	Puffer und Lösungen.....	20
6.1.3.2.	Gelelektrophorese	20
6.1.4.	Isolierung von DNA aus Agarosegelen	21
6.2.	Restriktionshydrolyse.....	21
6.3.	Ligation von DNA-Fragmenten	21
6.4.	Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)	21
6.4.1.	Standard-PCR.....	21
6.4.2.	Aufreinigung von PCR-Produkten	22
6.4.3.	Ligation von PCR-Produkten	22
6.4.4.	Einführung von Restriktionsschnittstellen	22
6.5.	Klonierung und Plasmidpräparation	23
6.5.1.	Herstellung kompetenter Zellen	23
6.5.1.1.	Puffer und Lösungen.....	23
6.5.1.2.	Durchführung.....	24
6.5.2.	Transformation von <i>E. coli</i>	24
6.5.3.	Plasmidpräparation.....	24
6.6.	Sequenzierung von PCR-Produkten und Plasmid-DNA	25
6.7.	Pulsfeldgelelektrophorese (PFGE).....	25
6.7.1.	Puffer und Lösungen	25
6.7.2.	Präparation der DNA im Agaroseblöckchen.....	26
6.7.3.	Restriktionshydrolyse.....	27
6.7.4.	Durchführung der PFGE	27
6.8.	Nachweis von 16S rRNA Genen in restriktionsverdauter DNA	28
6.8.1.	Puffer und Lösungen	28
6.8.2.	Herstellung einer DIG-markierten DNA-Sonde.....	29
6.8.3.	Transfer restriktionsverdauter DNA auf Nylonmembranen (Southern Blot)	29
6.8.4.	DNA-Hybridisierung mit der DIG-markierten Sonde.....	30
6.8.5.	Colorimetrischer Nachweis DIG-markierter DNA.....	30
6.9.	Ganzzellhybridisierung	31
6.9.1.	Puffer und Lösungen	31
6.9.2.	Beschichtung der Objektträger	32
6.9.3.	Fixieren der Zellen	32
6.9.4.	Aufbringen der Zellen auf Objektträger	32
6.9.5.	Hybridisierung.....	33
7.	Proteinchemische Methoden.....	34
7.1.	Expression von rekombinantem Protein in <i>E. coli</i>	34
7.1.1.	Verwendete Expressionssysteme	34
7.1.2.	Durchführung der Proteinexpression.....	34
7.2.	Reinigung von rekombinantem Protein.....	35
7.2.1.	Reinigung von rekombinantem PolN unter nativen Bedingungen	35

7.2.2.	Reinigung von rekombinantem PolC unter denaturierenden Bedingungen	36
7.3.	Analyse von Proteinlösungen.....	37
7.3.1.	Proteinmengen-Bestimmung (Bicincholinsäure-Test)	37
7.3.2.	SDS-PAGE nach Laemmli.....	37
7.3.3.	Coomassie-Färbung und Trocknung von SDS-Gelen	38
7.4.	Western Blot	38
7.4.1.	Transfer von Protein auf PVDF-Membranen	39
7.4.2.	Immunologischer Nachweis	39
7.5.	Aktivitätsbestimmung des <i>trans</i> -spleißenden Inteins der <i>N. equitans</i> DNA-Polymerase B	39
7.6.	Bestimmung der ATPase Aktivität	40
7.6.1.	Membranpräparation	40
7.6.2.	ATPase-Aktivitätstest.....	41
8.	Auswertung von DNA- und Protein-Sequenzen.....	42
8.1.	Genom-Annotierung	42
8.2.	Phylogenetische Analysen	42
8.3.	Rekonstruktion der Sekundärstruktur von 16S rRNA.....	43
III.	ERGEBNISSE	44
A.	Identifizierung von <i>Nanoarchaeum equitans</i>.....	44
1.	Isolierung und Sequenzanalyse eines neuartigen 16S rRNA Gens aus der Co-Kultur KIN4/M.....	44
1.1.	Restriktionskartierung.....	44
1.2.	Klonierung des zusätzlichen 16S rRNA Gens aus der Co-Kultur KIN4/M	45
1.3.	Sequenzanalyse des Plasmids pMH2	45
2.	Ganzzellhybridisierungen der Co-Kultur KIN4/M.....	45
2.1.	Konstruktion von Hybridisierungssonden.....	45
2.2.	Ganzzellhybridisierung mit <i>N. equitans</i> -spezifischen Sonden.....	46
3.	Phylogenetische Einordnung von <i>N. equitans</i>	48
4.	Darstellung der Sekundärstruktur der 16S rRNA	50
5.	Anzucht der Co-Kultur KIN4/M in Großkulturen.....	51
5.1.	Wachstum unter autotrophen Bedingungen und einem Gasfluss von 1 l/min.....	51
5.2.	Wachstum unter autotrophen Bedingungen und einem Gasfluss von 20 l/min.....	52
6.	Abschätzung der Genomgröße von <i>N. equitans</i> durch Puls-Feld-Gelelektrophorese (PFGE)	53

B. Verbreitung der Nanoarchaeota	55
1. Nachweis von Nanoarchaeota in Umweltproben durch PCR mit Nanoarchaeota-spezifischen Primern	55
2. Anreicherung von Vertretern der Nanoarchaeota aus Umweltproben	61
3. Identifizierung neuer Vertreter der Nanoarchaeota durch Ganzzellhybridisierungen	63
3.1. Konstruktion von Hybridisierungssonden.....	63
3.2. Hybridisierungsergebnis mit den CU1-Nanoarchaeota-spezifischen Sonden.....	64
C. Analyse des Genoms von <i>N. equitans</i>	65
1. Genomsequenzierung und Genomrekonstruktion.....	65
2. Genomanalyse.....	65
2.1. Identifizierung codierender DNA Sequenzen	65
2.2. „Codon Usage“	66
2.3. Annotierung proteincodierender Sequenzen	67
2.4. Zusammenfassung der Annotierungsergebnisse	68
2.4.1. Metabolismus und Haushaltsgene	68
2.4.2. Zellzyklus, DNA-Replikation, -Rekombination und -Reparatur.....	69
2.4.3. Transkription	69
2.4.4. Translation.....	69
2.4.5. Gespaltene Gene.....	70
2.4.6. Pseudogene.....	71
3. Erstellung phylogenetischer Stammbäume aus Konkatemeren ribosomaler Proteine	71
D. Experimentelle Überprüfung von Ergebnissen der Genomanalyse	74
1. Nachweis eines <i>trans</i>-spleißenden Mini-Inteins in der DNA-Polymerase B von <i>N. equitans</i>	74
1.1. Sequenzanalyse von PolN und PolC	74
1.2. Klonierung von polN und polC.....	76
1.3. Herstellung rekombinanter Untereinheiten	76
1.3.1. Expression in <i>E. coli</i>	76
1.3.2. Reinigung von PolN.....	77
1.3.3. Reinigung von PolC	78
1.4. Spleißen des gespaltenen Inteins.....	79
2. Untersuchung der ATPase von <i>N. equitans</i>	80
2.1. Nachweis von ATPase-Aktivität in Membranen.....	80
2.2. Temperaturabhängigkeit der ATPase.....	81
2.3. pH-Abhängigkeit.....	81

2.4.	Abhängigkeit von Kationen und Anionen.....	82
2.5.	Inhibitoren.....	82
IV.	DISKUSSION.....	84
V.	ZUSAMMENFASSUNG.....	95
VI.	ANHANG	96
VII.	LITERATURVERZEICHNIS.....	101

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
abs.	absolut
Ac	Acetat
APS	Ammoniumperoxodisulfat
BBR	Bakterienbank Regensburg
BCIP	5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl-Phosphat
bp	Basenpaare
CDS	Protein-codierende DNA Sequenz
CTAB	Cetyltrimethylammoniumbromid
DIG	Digoxygenin
dNTP	desoxy-Nukleosidtriphosphate (dATP, dCTP, dGTP, dTTP, dUTP)
F	vorwärts
IPTG	Isopropyl- β -D-Thiogalaktopyranosid
kb	Kilobasen
min.	Minute
MOPS	4-Morpholinpropansulfonsäure
OD _x	Optische Dichte bei der Wellenlänge x
PCR	Polymerase-Ketten-Reaktion
R	rückwärts
rDNA	ribosomale Desoxyribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat
sek.	Sekunde
Tab.	Tabelle
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
TWEEN 20	Polyoxyethylensorbitanmonolaurat
U	Unit
ÜN	über Nacht
Upm	Umdrehungen pro Minute
Vol.	Volumen
X-Gal	5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl- β -D-galaktopyranosid

I. Einleitung

Vergleichende Sequenzanalysen von 16S rRNAs führten gegen Ende der 70er Jahre zu der Erkenntnis, dass die Prokaryonten keine monophyletische Gruppe darstellen, sondern sich in zwei phylogenetische Abstammungslinien aufspalten. Den Bakterien, die sich entwicklungsgeschichtlich am frühesten differenzierten, wurden die Archaeen gegenübergestellt, die zu den Bakterien nicht näher verwandt sind als zu den Eukaryonten (Woese und Fox, 1977; Balch et al., 1977). Dementsprechend werden heute alle Organismen in die drei Domänen Eukarya, Bacteria und Archaea eingeteilt (Woese et al., 1990). Die bisher kultivierten Vertreter der Domäne Archaea werden in die zwei phylogenetischen Reiche Crenarchaeota und Euryarchaeota eingeordnet. Diese Klassifizierung stützt sich im Wesentlichen auf Vergleiche von 16S rRNA Sequenzen (Woese et al., 1990), konnte aber auch durch Sequenzvergleiche anderer konservierter Makromoleküle wie Elongationsfaktoren (Creti et al., 1994), Untereinheiten der RNA-Polymerase (Klenk und Zillig, 1994; Matte-Tailliez et al., 2002) und das archaeelle Rekombinationsenzym RadA (Sandler et al., 1999) sowie durch aneinandergereihte Aminosäuresequenzen ribosomaler Proteine (Matte-Tailliez et al., 2002) bestätigt werden.

Aus beiden prokaryotischen Domänen (Bacteria und Archaea) wurden Mikroorganismen isoliert, die als hyperthermophil bezeichnet werden. Dabei handelt es sich definitionsgemäß um Organismen, deren optimale Wachstumstemperatur mindestens 80°C beträgt und die in der Regel bei Temperaturen von weniger als 60°C nicht mehr vermehrungsfähig sind (Stetter, 1989). Zu den natürlichen Lebensräumen hyperthermophiler Mikroorganismen zählen unter anderem heiße marine Biotope entlang tektonischer Bruchzonen in der Tiefsee (z.B. am Ostpazifischen Rücken) oder in küstennahen, flacheren Gewässern (z.B. das Kolbeinsey Gebiet nördlich von Island) sowie terrestrische Hochtemperatur-Biotope wie Solfatarenfelder und heiße Süßwasserquellen, beispielsweise auf Kamtschatka (Russland) oder im Yellowstone Nationalpark (USA).

Im auf 16S rRNA Sequenzen basierenden Stammbaum besetzen Hyperthermophile ausnahmslos die tiefsten Abzweigungen mit den kürzesten Astlängen (Stetter, 1992). Innerhalb der Bacteria zählen dazu die Vertreter der Ordnungen *Thermotogales* und *Aquificales*. Bei den Archaea besetzen Hyperthermophile die tiefsten Abzweige sowohl innerhalb der Euryarchaeota als auch innerhalb der Crenarchaeota. Bei den Euryarchaeota sind dies Vertreter der Ordnungen *Methanopyrales*, *Pyrococcales*, *Methanococcales* und *Archaeoglobales* und bei den Crenarchaeota Vertreter der Ordnungen *Thermoproteales* und

Desulfurococcales. Die kurzen Evolutionslinien dieser Organismen im phylogenetischen Baum deuten auf niedrige Mutationsraten ihrer ribosomalen RNA hin und damit auf eine langsame Evolutionsgeschwindigkeit (Woese, 1987). Aus diesem Grund wird angenommen, dass die hyperthermophile Lebensweise ein urtümliches Merkmal darstellt (Stetter, 1995; Stetter, 1999) und dass der letzte gemeinsame Vorfahre aller Lebewesen hyperthermophil war (Stetter, 1994).

Aus Hochtemperaturbiotopen konnten mittlerweile mehr als 70 Spezies hyperthermophiler Archaeen isoliert werden, die eine Vielzahl physiologischer und biochemischer Fähigkeiten aufweisen. Das Spektrum reicht dabei von obligat chemolithoautotrophen zu strikt organotrophen, von aeroben zu anaeroben und von extrem acidophilen zu alkaliphilen Organismen (zusammengefasst in Stetter, 1996). Auch morphologisch sind die bisher kultivierten hyperthermophilen Archaeen außerordentlich divers. Ungewöhnliche Zellformen wie Scheiben, Netzwerke und gelappte Kokken sind ebenso bekannt wie „Golfschlägerformen“ und verzweigte Stäbchen (Stetter, 1998). Kokkoide Vertreter der *Desulfurococcales* weisen sehr variable Zelldurchmesser von 0,5 – 2 µm, in seltenen Fällen sogar bis zu 15 µm (Gattung *Staphylothermus*; Fiala et al., 1986) auf. Stäbchenförmige Organismen der *Thermoproteales* haben Längen von 1 bis über 100 µm, wobei der Zelldurchmesser in der Regel zwischen 0,4 und 1 µm liegt und im Extremfall sogar nur 0,15 µm betragen kann (Gattung *Thermofilum*; Burggraf et al., 1997).

Generell stellen jedoch die bisher kultivierten Mikroorganismen nur einen geringen Anteil der tatsächlichen Artenvielfalt in der Umwelt dar, und man geht davon aus, dass mehr als 99% der in Umweltproben enthaltenen Mikroben bisher nicht kultiviert sind (Ward et al., 1990; Amann et al., 1995). Ein tieferer Einblick in die Diversität mikrobieller Ökosysteme erschien erst durch die Entwicklung molekularbiologischer Methoden möglich: Eine erstmals von Norman Pace und Kollegen (Olsen et al., 1986) vorgeschlagene Strategie zur kultivierungsunabhängigen Charakterisierung mikrobieller Lebensgemeinschaften macht sich die hohe Konserviertheit der in allen Lebewesen vorhandenen ribosomalen RNA zunutze. Am Anfang dieser heute routinemäßig angewandten Methode steht die Isolierung von DNA direkt aus einer Umweltprobe. Mit Hilfe der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) werden daraus die rRNA Gene amplifiziert. Dazu werden Primer verwendet, die spezifisch an konservierte Bereiche der 16S rDNA von Bacteria oder Archaea bzw. der 18S rDNA von Eukarya binden. Anschließend können die PCR-Produkte sequenziert und mit 16S rRNA-Sequenzen bekannter Organismen verglichen werden. Eine weitere Methode der Differenzierung, die ebenfalls auf Analyse der 16S rRNA beruht, stellt die Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung (FISH) dar.

Hierbei werden permeabilisierte Zellen mit kurzen, fluoreszenzmarkierten Oligonukleotidsonden angefärbt, die gegen spezifische Sequenzbereiche der 16S rRNA gerichtet sind (DeLong et al., 1989; Stahl und Amann, 1991; Amann et al., 1997). Die Anwendung dieser Technik auf Mikroorganismen aus Umweltproben oder Anreicherungskulturen erlaubt die Zuordnung neu entdeckter 16S rRNA Sequenzen zu den zugehörigen Zellmorphotypen. In den letzten Jahren wurde eine Vielzahl von PCR-Primern und Oligonukleotidsonden entwickelt, die als Ordnungs-, Reich-, Domänen-spezifisch oder sogar als universell für alle Archaea, Bacteria und Eukarya betrachtet wurden (Stahl und Amann, 1991; Burggraf, 1994; Raskin et al., 1994; Eder et al., 1999; Behrens et al., 2003). Mit diesen auf der PCR basierenden Techniken erschien es möglich, alle in einem Biotop enthaltenen Organismen erfassen zu können. Tatsächlich wurde bei Untersuchungen unterschiedlichster Lebensräume wie Böden (Bintrim et al., 1997; Liesack und Stackebrandt, 1992), Süßwasser (Schleper et al., 1997; Keough et al., 2003), heißen Quellen (Barns et al., 1994; Hugenholtz et al., 1998), Seewasser (Massana et al., 1997; Eder et al., 2002), marinen Sedimenten (DeLong, 1992; Munson et al., 1997) oder marinem Pikoplankton (DeLong et al., 1994) eine Vielzahl neuartiger 16S rRNA Sequenzen gefunden, die keine nähere Verwandtschaft zu denen von kultivierten Organismen aufwiesen. Während beispielsweise innerhalb der Crenarchaeota ausschließlich (hyper-)thermophile Vertreter in Kultur gebracht werden konnten, legen molekulare Untersuchungen nahe, dass etwa 20% des marinen Pikoplanktons weltweit aus mesophilen Vertretern dieses Reiches besteht (Karner et al., 2001). Bei der Analyse eines Heißwassertümpels im Yellowstone Nationalpark wurden sogar 16S rRNA Sequenzen gefunden, die innerhalb der archaeellen Domäne sehr tief – noch vor der Aufspaltung von Cren- und Euryarchaeota – abzweigen, und damit ein drittes, als „Korarchaeota“ bezeichnetes Reich der Archaea darstellen (Barns et al., 1994). Die zugehörigen Organismen sind jedoch noch völlig unbekannt (Amann, 2000).

Die Erforschung von Mikroorganismen auf molekularbiologischer Ebene hat in den letzten Jahren vor allem von der rasanten Entwicklung und Automatisierung von Sequenzierungstechniken profitiert. Mittlerweile wurden die Genome von 122 Prokaryonten sequenziert, und mehr als 500 weitere sind in Bearbeitung. Unter den bereits veröffentlichten Sequenzen befinden sich auch die Genome von 16 Archaeen, darunter die von zehn Hyperthermophilen aus den archaeellen Reichen der Euryarchaeota und Crenarchaeota. Die Analyse der archaeellen Genome hat u.a. gezeigt, dass die Mehrheit der Enzyme, die Transkription, Translation und Replikation steuern, denen der Eukarya ähneln. Dagegen ist ein großer Teil der Genprodukte, die den Energiestoffwechsel und die Zellteilung betreffen,

denen von Bacteria ähnlicher (Gaasterland, 1999; Koonin et al., 1997). Zusätzlich wurde eine Vielzahl von Genen identifiziert, deren Verbreitung sich bisher ausschließlich auf die Archaea beschränkt. Die Funktion der meisten dieser Archaea-spezifischen Gene ist jedoch noch weitestgehend unbekannt (Graham et al., 2000). Die Auswertung von Genomdaten konnte vielfach unsere Erkenntnisse über die Stoffwechselfähigkeiten der zugehörigen Organismen vertiefen (Fitz-Gibbon et al., 2002; Klenk et al., 1997; Ruepp et al., 2000). Im Falle des obligat parasitischen Bakteriums *Tropheryma whipplei* hat die Genomauswertung sogar den Schlüssel zum axenischen Wachstum für diesen, bis dahin nicht in Reinkultur erhaltenen, Organismus geliefert (Renesto et al., 2003). Dennoch ist die Bestimmung einer Genomsequenz noch nicht mit deren Verständnis gleichzusetzen. Die Funktion der meisten, der in einem Genom codierten Proteine, wird nicht experimentell bestimmt, sondern die Zuordnung beruht auf Sequenzvergleichen mit bereits charakterisierten orthologen Proteinen aus anderen Organismen. Oft ist die Sequenzähnlichkeit dabei so gering, dass für das entsprechende Protein bestenfalls eine allgemeine Funktion angegeben werden kann. Zudem besteht mindestens ein Viertel jedes bisher untersuchten Genoms aus „hypothetischen“ Genen, d.h. Genen, deren Funktion noch unbekannt ist. Beispielsweise enthält das Genom des Archaeons *Aeropyrum pernix* mehr als 1500 offene Leserahmen (57% seines gesamten Gensatzes), zu denen keine Homologen in den Genomen anderer Organismen gefunden werden konnten (Kawarabayasi et al., 1999).

Die Auswertung von Genomdaten kann zwar wichtige Anhaltspunkte für die biochemischen Fähigkeiten von Mikroorganismen liefern, Untersuchungen am kultivierten Organismus bleiben jedoch eine unabdingbare Voraussetzung für ein tieferes Verständnis seiner Physiologie und der komplexen Interaktionen mit seiner Umwelt (Palleroni, 1997).

Aus Gesteinsproben eines marinen Hydrothermalsystems am Kolbeinsey-Rücken nördlich von Island, wurde in unserem Labor ein neuartiger, autotropher, Schwefel-reduzierender Vertreter der archaellen Gattung *Ignicoccus* angereichert. Im Gegensatz zu den bereits bekannten *Ignicoccus* Spezies (Huber et al., 2000) waren einige Zellen von *Ignicoccus* sp. KIN4/I mit sehr kleinen kokkoiden Anhängseln besetzt, die einen Durchmesser von 400 nm aufwiesen und mit dem DNA-bindenden Farbstoff DAPI ein starkes Fluoreszenzsignal zeigten (Kronner, 1998). Versuche an einer definierten als KIN4/M bezeichneten Co-Kultur aus *Ignicoccus* sp. KIN4/I und kleinen Kokken, mit Hilfe der PCR ein mögliches 16S rRNA Gen der kleinen Kokken zu amplifizieren, blieben trotz der Verwendung von Kombinationen unterschiedlicher universeller, Archaea- oder Bacteria-spezifischer Primer ohne Erfolg (Tanja Fuchs, persönliche Mitteilung). Nach Fixierung restriktionsverdauter und in einem

Agarosegel aufgetrennter genomischer DNA auf einer Nylonmembran und anschließender Hybridisierung mit einer 16S rDNA-spezifischen Nukleotidsonde zeigte sich jedoch, dass in der Co-Kultur KIN4/M zwei unterschiedliche 16S rRNA Gene vorhanden sind (Hohn, 2000). In der auf die gleiche Weise behandelten genomischen DNA der *Ignicoccus*-Reinkultur war dagegen nur ein 16S rRNA Gen nachweisbar, das mit einem der beiden Gene der Co-Kultur identisch war. Demnach sollte das zusätzliche 16S rRNA Gen in der Co-Kultur von den kleinen Kokken stammen. Versuche, dieses zweite Gen zu isolieren, blieben jedoch erfolglos (Hohn, 2000).

Ziel dieser Arbeit war es, Sequenz und Herkunft des unbekanntes 16S rRNA Gens aus der Co-Kultur KIN4/M aufzuklären. Sollte sich zeigen lassen, dass das Gen aus den kleinen Kokken stammt und in diesen auch exprimiert wird, wäre der Beweis erbracht, dass es sich hierbei um einen eigenständigen zellulären Organismus handelt. Dieser sollte darauf phylogenetisch klassifiziert und durch biochemische und molekularbiologische Untersuchungen weiter charakterisiert werden.

II. Material und Methoden

1. Bezugsquellen von Substanzen

1.1. Chemikalien

Substanz	Hersteller/Firma
Acrylamid-Bis-Fertiglösung (37,5 : 1)	Roth, Karlsruhe
Agar	Oxoid, Basingstoke, UK
Agarose	Appligene, Heidelberg
Agarose, low melt	Serva, Heidelberg
Agarose, SeaKem LE	Biozym, Oldendorf
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Ampicillin	USB, Braunschweig
AquaPhenol	Appligene, Heidelberg
Blockierungsreagenz (Brij 58)	Roche, Mannheim
5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl-Phosphat (BCIP)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Bromphenolblau	Roche, Mannheim
Chloramphenicol	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Citifluor AF1	USB, Braunschweig
Coomassie Blau R	UKC, Chem. Lab., Canterbury, UK
Desoxynukleosid-Triphosphate (dNTPs)	Serva, Heidelberg
DIG Easy Hyb	Roche, Mannheim
DIG-11-dUTP	Roche, Mannheim
Ethanol _{absolut}	Roche, Mannheim
Ethidiumbromid	J.T. Baker, Deventer, NL
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Serva, Heidelberg
Gelatine	Serva, Heidelberg
Glycerin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Hefeextrakt	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Isopropyl-β-D-Thiogalaktopyranosid (IPTG)	Difco, Detroit, USA
KCr(SO ₄) ₂	Roth, Karlsruhe
2-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
	Roth, Karlsruhe

2-[N-Morpholino]ethansulfonsäure (MES)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
4-Morpholinpropansulfonsäure (MOPS)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
4-Nitroblau-Tetrazoliumchlorid (NBT)	Roche, Mannheim
N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Serva, Heidelberg
Resazurin	Serva, Heidelberg
Rubidiumchlorid	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Tris(hydroxymethyl)aminomethan (Tris)	USB, Braunschweig
Polyoxyethylensorbitanmonolaurat (Tween 20)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl- β -D-galaktopyranosid (X-Gal)	Roche, Mannheim

Alle anderen Substanzen wurden von der Firma VWR, Darmstadt, bezogen. Der Reinheitsgrad aller Substanzen war, sofern nicht anders angegeben, p.a..

1.2. Enzyme, Vektoren und Reaktionskits

Substanz	Hersteller/Firma
AmpliTaq DNA Polymerase	Roche, Mannheim
Anti-Digoxigenin-AP, Fab Fragments	Roche, Mannheim
<i>EcoRI</i> , <i>HindIII</i> , <i>BamHI</i> , <i>XhoI</i>	Roche, Mannheim
<i>AscI</i> , <i>BssHII</i> , <i>NotI</i> , <i>PacI</i> , <i>SacII</i>	NEB, Frankfurt
Complete Mini, Proteasen-Inhibitoren-Cocktail	Roche, Mannheim
Proteinase K	Roche, Mannheim
RNase, DNase-frei	Roche, Mannheim
T4-DNA-Ligase	Roche, Mannheim

Plasmide

pET Expression System 16b	Novagen, Madison, USA
pET Expression System 25b	Novagen, Madison, USA
pUC18	Invitrogen, Karlsruhe
pDRIVE	Qiagen, Hilden

Reaktionskits

BCA Kit for Protein Determination	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
BugBuster TM Ni-NTA His-Bind Purification Kit	Novagen, Madison, USA
His-Tag [®] AP Western Reagents	Novagen, Madison, USA
QIAGEN PCR Cloning ^{plus} Kit	Qiagen, Hilden
QIAprep Spin Miniprep Kit	Qiagen, Hilden
QIAquick Gel Extraction Kit	Qiagen, Hilden
QIAquick PCR Purification Kit	Qiagen, Hilden

1.3. Organismen und 16S rRNA Klonsequenzen

Organismus	Stamm	Kultursammlung	16S rRNA Accession-Nr. (GenBank)
<i>Ignicoccus</i> sp.	KIN4/I	BBR 17/12/4	AJ318042
<i>Nanoarchaeum equitans</i>	KIN4/M	BBR 17/10/4	AJ318041
Klon OP9	OP9	-	AJ458436
Klon CU1	CU1	-	AJ458437
<i>Escherichia coli</i>	Dh5 α ¹	-	-
<i>Escherichia coli</i>	BL21 (DE3) ²	-	-
<i>Escherichia coli</i>	Rosetta ^{TM2}	-	-
<i>Escherichia coli</i>	QIAGEN EZ ³	-	-

Bezugsquellen: ¹ Life Technologies, Gaithersburg, USA; ² Novagen, Madison, USA; ³ Qiagen, Hilden.

1.4. Oligonukleotidprimer und –sonden

Alle Oligonukleotide wurden von der Firma Metabion, Martinsried bezogen.

Bezeichnung	Position	Sequenz (5' → 3')	Literatur
8aF	8-23	TCY GGT TGA TCC TGC C	(Eder et al., 1999)
109aF	109-125	ACK GCT CAG TAA CAC GT	(Grosskopf et al., 1998)
519uF	519-536	CAG CMG CCG CGG TAA TAC	(Eder et al., 1999)
1119aR	1101-1119	GGY RSG GGT CTC GCT CGT T	(Burggraf, 1994)
1512uR	1492-1512	ACG GHT ACC TTG TTA CGA CTT	(Eder et al., 1999)
7mcF	7-23	CTC CCG TTG ATC CTG CG	(Hohn et al., 2002)
518mcF	518-536	GCA GCC GCC GCG GGA ACA C	(Hohn et al., 2002)
520mcR	501-520	TGC CAC CCC TCT TGC CCA C	unveröffentlicht
1116mcR	1100-1116	GCG GGT CTC GCC TGT TT	(Hohn et al., 2002)
1511mcR	1490-1511	CGG CTA CCT TGT GTC GAC TTA G	(Hohn et al., 2002)
934pbmcR	915-934	Cy3-GTG CCC CCC CGC CTA TTC CT	unveröffentlicht
515pbmcR	499-515	Cy3-CCC CTC TTG CCC ACC GCT	unveröffentlicht
359pbmcR	340-359	Cy3-CCC TGG TGC ATC CCG TAG GA	unveröffentlicht
511eaR	498-511	RhoGr-CTT GCC CRG CCC TT	(Burggraf, 1994)
515caR	499-515	RhoGr-CCA GWC TTG CCC CCC GCT	(Burggraf, 1994)
934aR	915-934	RhoGr-GTG CTC CCC CGC CAA TTC CT	(Stahl und Amann, 1991)
PolN_F	-	GGG <u>ACT CGA GAG</u> GAT GTT ACA CCA CAT CCC CA	unveröffentlicht
PolN_R	-	CTT <u>GTG GAT CCA</u> GAA TCT GCG TTA ATT AT	unveröffentlicht
PolC_F	-	TTT AAA <u>TGG ATC CTA</u> TGC GCT ATC TTG GCA AAA AGA GAG	unveröffentlicht
PolC_R	-	GAT CTT TCC <u>CTC GAG</u> TTT AAA GAA ATC TGT TAG TTT TTT GCT	unveröffentlicht

Tab. 1: Positions- und Orientierungsangaben (F = forward, R = reverse) beziehen sich auf die entsprechende Position in der 16S rRNA von *E. coli* (Brosius et al., 1981). a = Archaea-spezifisch; ca = Crenarchaeota-spezifisch; ea = Euryarchaeota-spezifisch; mc = spezifisch für *Nanoarchaeum equitans*; pbmc = spezifisch für Klon CU1; u = „universell“ mit Ausnahme der Nanoarchaeota; Cy3 = Indocarbocyanin; RhoGr = Rhodamin Green; Restriktionsschnittstellen für *Bam*HI und *Xho*I sind unterstrichen;

H = A/C/T; M = A/C; R = A/G; S = G/C; W = A/T; Y = C/T;

2. Medien und Substrate

2.1. Medien

2.1.1. LB-Medium (Miller, 1972)

	Trypton	10,0 g
	Hefeextrakt	5,0 g
	NaCl	5,0 g
	H ₂ O _{bidest}	ad 1000 ml
für Gußplatten	Agar	15 g pro 1000 ml Medium

2.1.2. ½SME-Medium (Stetter et al., 1983); modifiziert nach Huber (Huber et al., 2003)

NaCl	13,85 g
MgSO ₄ x 7 H ₂ O	3,50 g
MgCl ₂ x 6 H ₂ O	2,75 g
KH ₂ PO ₄	0,5 g
NH ₄ Cl	0,5 g
CaCl ₂ x 2 H ₂ O	0,38 g
NaHCO ₃	0,16 g
KCl	0,33 g
NaBr	50 mg
H ₃ BO ₃	15 mg
SrCl ₂ x 6 H ₂ O	7,5 mg
KI	0,05 mg
H ₂ O _{bidest}	ad 1000 ml

Dem Medium wurden zusätzlich 10 g elementarer Schwefel zugegeben. Der pH-Wert wurde mit H₂SO₄ auf 5,5 eingestellt. Als Gasphase wurde H₂/CO₂ (80:20, v/v) mit einem Druck von 300 kPa aufgedrückt.

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

$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$		1,30 g
KH_2PO_4		0,28 g
$\text{MgSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$		0,25 g
$\text{CaCl}_2 \times 2 \text{H}_2\text{O}$		0,07 g
$\text{FeCl}_3 \times 6 \text{H}_2\text{O}$	(40 mg/ml)	0,50 ml
$\text{MnCl}_2 \times 4 \text{H}_2\text{O}$	(10 mg/ml)	0,18 ml
$\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_6 \times 10 \text{H}_2\text{O}$	(10 mg/ml)	0,45 ml
$\text{ZnSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$	(10 mg/ml)	0,022 ml
$\text{CuCl}_2 \times 2 \text{H}_2\text{O}$	(1 mg/ml)	0,05 ml
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$	(1 mg/ml)	0,03 ml
$\text{V}_2\text{O}_5 \times 5 \text{H}_2\text{O}$	(1,27 mg/ml)	0,03 ml
$\text{CoSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$	(1 mg/ml)	0,01 ml
Wolfe's Vitaminelexier (1x)		10 ml
$\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$		ad 1000 ml

Dem Medium wurde zusätzlich 10 g elementarer Schwefel zugesetzt, und der pH-Wert mit 5N NaOH auf 6,0 - 6,5 eingestellt. Als Gasphase wurde N_2/CO_2 (80:20, v/v) mit einem Druck von 300 kPa aufgepresst.

Wolfe's Vitaminelexier (Balch et al., 1979)

Biotin	2,0 mg
Folsäure	2,0 mg
Pyridoxamindihydrochlorid (B6)	10,0 mg
Thiamindichlorid (B1)	5,0 mg
Riboflavin (B2)	5,0 mg
Nicotinsäure	5,0 mg
D(+)-Calciumpantothenat	5,0 mg
Cyanocobalamin (B12)	0,1 mg
4-Aminobenzoessäure	5,0 mg
Liponsäure	5,0 mg
$\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$	ad 1000 ml

Die Lösung wurde in einer dunklen Flasche bei 4°C aufbewahrt.

2.2. Herstellung der Kulturmedien

2.2.1. Aerobe Medien

LB-Medium wurde zu 10 ml in Reagenzgläser abgefüllt, und diese mit Alukappen versehen. Für größere Anzuchten wurden Erlenmeyerkolben verwendet, die maximal zu 20% befüllt und mit Zellstoffstopfen verschlossen wurden. Dem LB-Medium wurde je nach Bedarf 100 µg/ml Ampicillin bzw. 32 µg/ml Chloramphenicol zugesetzt.

2.2.2. Anaerobe Medien

Das Kulturmedium wurde in eine 1 l-Duranglasflasche (Schott) abgefüllt, und diese mit einem Gummistopfen und einer durchbohrten Schraubkappe (Schott GL 45) verschlossen. Anschließend wurde das Medium für 30 min. unter Druckausgleich mit N₂/CO₂ durchgast. Der restliche Sauerstoff im Medium wurde durch Zugabe von 0,5 g/l Na₂S×7-9 H₂O gebunden. Als Redoxindikator wurden 2 mg/l Resazurin zugesetzt. Der pH-Wert wurde nach Bedarf eingestellt, und das Medium in der Anaerobenkammer (Coy Laboratory Products Inc., Arbor, USA) zu je 20 ml in 120 ml Serumflaschen (Natronkalk-Silikat-Glas, Stute GmbH, Rheinbreitbach) abgefüllt. Diese wurden mit Gummistopfen verschlossen und mit Aluminiumkappen (Bellco Glass, New Jersey, USA) gesichert. Abschließend wurden die Serumflaschen an der Gasstation je dreimal evakuiert, und 300 kPa des gewünschten Gasgemisches aufgedrückt.

2.3. Substrate

Organische Medienzusätze sowie anorganische Substrate wurden als 10%-ige Stammlösungen aerob und anaerob hergestellt und erst unmittelbar vor dem Animpfen dem Medium steril zugegeben.

3. Sterilisation

Aerobe und anaerobe nicht schwefelhaltige Medien, hitzeunempfindliche Substrat-Stammlösungen und Puffer wurden 20 min. bei 121°C und 200 kPa Druck unter feuchter

Hitze autoklaviert (SANOKlav, Wolf, Geislingen). Schwefelhaltige Medien wurden 60 min. bei 110°C und 150 kPa Druck unter feuchter Hitze im Autoklaven sterilisiert.

Hitzeempfindliche Substrate wurden über Cellulose-Acetat-Filter sterilfiltriert (Porengröße 0,22 µm, Millipore, Bedford, USA).

Spritzen, Eppendorfreaktionsgefäße, Glaswaren und Zentrifugenröhrchen wurden 40 min. bei 121°C autoklaviert (s.o.).

Zur Beseitigung von Verunreinigungen mit DNA wurden Zentrifugenröhrchen vor dem Autoklavieren in 3%-ige Chlorbleichlauge eingelegt und anschließend mit H₂O_{bidest} gespült.

4. Verwendete Organismen und deren Kultivierung

4.1. Routinemäßige Kultivierung

Die folgenden Organismen und Mischkulturen wurden in den aufgeführten Medien unter den angegebenen Bedingungen kultiviert:

Organismus / Stamm	Medium	pH	e ⁻ -Akzeptor und Medienzusatz	Gasphase	Temperatur
<i>Ignicoccus</i> sp. KIN4/I	½-SME	5,5	1% S ⁰	H ₂ /CO ₂	90°C
Co-Kultur KIN4/M	½-SME	5,5	1% S ⁰	H ₂ /CO ₂	90°C
Mischkultur CU1	Allen 6,0	6,0	1% S ⁰ 0,1% Hefeextrakt	N ₂ /CO ₂	85°C
Mischkultur OP9	Allen 6,0	6,0	1% S ⁰ 0,1% Hefeextrakt	N ₂ /CO ₂	85°C

Die Anzucht erfolgte in Heißluftinkubatoren unter Schütteln bei ca. 50 Upm.

4.2. Kultivierung im Großmaßstab

Zur Gewinnung größerer Zellmassen wurde die Co-Kultur KIN4/M anaerob in 300 l- bzw. 50 l-Fermentern (HTE, Bioengineering, Wald, Schweiz) gezüchtet. Die Medienbestandteile (1/2 SME-Medium) wurden eingewogen, im Fermenter in H₂O_{bidest} gelöst und 40 min. bei 121°C autoklaviert. Anschließend wurde steriler Hefeextrakt (Endkonzentration 0,1% (w/v)) und

elementarer Schwefel (Endkonzentration 1% (w/v)) zugegeben, und das Medium mit Na₂S (0,5 g/l) reduziert. Der pH-Wert wurde mit 25%-iger Schwefelsäure auf 5,5 - 6,0 eingestellt. Die Animpfdichte lag bei ca. 10⁵ Zellen/ml. Als Gasphase wurde H₂/CO₂ (80:20, v/v) verwendet, und die Rührgeschwindigkeit betrug 100 Upm. Während der Fermentation bei 90°C wurde zunächst mit ca. 2 l/min. H₂/CO₂ (80:20, v/v) durchgast. Ab einer Zellzahl von ca. 10⁶ Zellen/ml wurde wahlweise mit H₂/CO₂ (80:20, v/v) oder mit H₂/N₂/CO₂ (15:65:20, v/v/v) und einer Durchflussrate von 2 l/min oder 20 l/min (50 l-Fermenter) bzw. 30 l/min. (300 l-Fermenter) begast.

Zur Ernte wurden die Zellen zunächst auf 4°C gekühlt (Durchlaufkühler, Feichtenschläger, Neusäss), anaerob in einen Edelstahltank (Gresser, Regensburg) überführt und mit einer Durchlaufzentrifuge (Typ 416, Padberg, Lahr) bei einer Durchlaufgeschwindigkeit von 30 l/h geerntet. Die geernteten Zellmassen wurden in dem im Zentrifugenrotor verbliebenen Medienrestvolumen resuspendiert und entweder sofort weiterverarbeitet (siehe II.4.3), oder abzentrifugiert (Sorvall Superspeed RC2-B, GS3-Rotor, 9000 Upm, 30 min, 4°C), in flüssigem Stickstoff schockgefroren und über flüssigen Stickstoff bei -140°C aufbewahrt.

4.3. Aufreinigung von *N. equitans*-Zellmassen durch differenzielle Zentrifugation

Fermenterernten mit hohem Anteil von nicht an *Ignicoccus* sp. KIN4/I anhaftenden *N. equitans*-Zellen wurden mit 1,5%-iger NaCl-Lösung in einem Volumen von 2 l suspendiert und auf vier 500 ml-Zentrifugenbecher verteilt. Nach 30 min. Zentrifugation bei 4300 Upm (Jouan KR 4.22, C60-Rotor, 4°C) befanden sich im Überstand fast ausschließlich noch *N. equitans*-Zellen, während die *Ignicoccus* KIN4/I-Zellen sedimentiert waren. Der Zentrifugenüberstand wurde in GS3-Rotorbecher überführt, und die *N. equitans*-Zellen durch einstündige Zentrifugation bei 9000 Upm (Sorvall Superspeed RC2-B) geerntet.

5. Mikroskopie

5.1. Phasenkontrast- und Fluoreszenzmikroskopie

Zur Mikroskopie wurde ein Olympus BX 60 Phasenkontrastmikroskop verwendet, das mit einem Olympus U Plan FL 100x/1,30 Ölimmersionsobjektiv ausgestattet war. Für die Fluoreszenzmikroskopie wurden folgende Filtersätze verwendet:

Filtersatz	Anregungsfilter	Teilerspiegel	Sperrfilter
DAPI- Filtersatz	BP 360-370	DM 400	BA 420
Rhodamin Green- Filtersatz	BP 470-490	DM 500	BA 515
Cy3- Filtersatz	BP 530-550	DM 570	BA 590

Zur Dokumentation stand eine PixelFly CCD Kamera (PCO, Kelheim) mit CamWare Steuerungssoftware zur Verfügung. Die Aufnahmen wurden mit Photoshop 6.0 (Adobe) digital nachbearbeitet.

Konfokale Bildserien (optische z-Ebenen) von Rhodamin Green- und Cy3-markierten Präparaten wurden mit einem LEICA TCS SP2 konfokalen Mikroskop aufgenommen, das mit einem LEICA PL APO 63x/1,40 Objektiv ausgestattet war. Es wurden Laser-Wellenlängen von 488 nm (Argon) und 543 nm (HeNe) für grüne bzw. rote Fluoreszenzanregung verwendet. Zur Verbesserung der Auflösung der einzelnen Kanäle und zur Unterdrückung des Hintergrundrauschens wurde die Huygens Deconvolution Software (SVI, Hilversum, Niederlande) verwendet. Erhaltene Bilderserien wurden mit der Imaris Software (BITPLANE, Zürich, Schweiz) nachbearbeitet.

5.2. Bestimmung von Zellzahlen

Die Bestimmung von Zellzahlen wurde mit Hilfe einer Thoma-Zählkammer (Tiefe 0,02 mm) durchgeführt. Die Gesamtzellzahl lässt sich auf Grund des definierten Volumens der Kammer (0,02 mm x 0,0025 mm² pro Kleinstquadrat) nach folgender Formel ermitteln:

$$\text{Gesamtzellzahl / ml} = (\text{Anzahl der Zellen / Kleinstquadrat}) \times 2 \times 10^7$$

6. Molekulargenetische Methoden

6.1. Reinigung und Analyse von DNA

6.1.1. DNA-Isolierung

6.1.1.1. Puffer und Lösungen

<u>Puffer A:</u>	Tris/HCl pH 8,0	500 mM
	NaCl	100 mM
	Na ₃ Citrat	1 mM

<u>Puffer B:</u>	Tris/HCl pH 8,0	200 mM
	NaCl	100 mM
	SDS	4% (w/v)

Phenol: Appligene AquaPhenol wurde mit 0,1% Hydroxychinolin versetzt und mit einem mitgelieferten Puffer pH 8 nach Angaben des Herstellers ausgeschüttelt. Die Lagerung erfolgte in einer dunklen Flasche bei 4°C.

<u>NaCl-Lösung:</u>	NaCl	5 M
---------------------	------	-----

<u>NaCl/ CTAB-Lösung:</u>	NaCl (5M)	140 µl
	CTAB	100 mg
	H ₂ O _{bidest}	ad 1000 µl

6.1.1.2. DNA-Isolierung aus Flüssigkulturen (nach Barns et al., 1994; modifiziert)

60 ml gut bewachsene Zellkultur wurden für 20 min. bei 12000 Upm abzentrifugiert (SS34-Rotor, Sorvall Superspeed RC2-B), in 400 µl Puffer A aufgenommen und in ein steriles 2 ml-Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt. Um die Zellen aufzuschließen, wurde der Ansatz mit 1 Vol. Puffer B und 1 mg Proteinase K vermischt und eine Stunde bei 55°C inkubiert. Die vollständige Lyse der Zellen wurde mikroskopisch überprüft, und der Zellaufschluss, falls erforderlich, noch dreimal bei -70°C eingefroren und im Wasserbad bei 55°C aufgetaut.

Um Proteine und Histone, die für den Proteinase K-Abbau nicht zugänglich waren, von der DNA zu entfernen, wurden 130 µl 5 M NaCl Lösung zugegeben, und durch mehrmaliges Invertieren des Reaktionsgefäßes gut gemischt. Dann wurden 100 µl CTAB/NaCl Lösung zupipettiert, und der Ansatz, nach gründlichem Mischen, für 10 min. bei 65°C inkubiert.

Anschließend wurde das Zell-Lysat mit 1 Vol. Phenol ausgeschüttelt und 10 min. in der Tischzentrifuge bei 13000 Upm und 4°C zentrifugiert. Die wässrige Phase wurde abgezogen und erneut mit 1 Vol. Phenol:Chloroform:Isoamylalkohol (25:24:1) und schließlich mit 1 Vol. Chloroform:Isoamylalkohol (24:1) ausgeschüttelt.

Der wässrige Überstand wurde in ein frisches Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt, und die DNA durch Zugabe von 0,6 Vol. Isopropanol für 10 min. bei Raumtemperatur gefällt. Nach dem Abzentrifugieren (Tischzentrifuge, 13000 Upm, 15 min., 4°C) wurde der Niederschlag mit eiskaltem 70%-igem Ethanol gewaschen, im Exsikkator getrocknet und in 10-30 µl H₂O_{bidest} resuspendiert.

6.1.1.3. DNA-Isolierung aus Umweltproben (nach Barns et al., 1994; modifiziert)

Jeweils 5-7 g der in Tab. 2 aufgeführten Schlamm-, Gesteins-, und Bodenproben wurden in der Anaerobenkammer in ein 50 ml-Falcon-Reaktionsgefäß gefüllt. Nach Zugabe von 3 ml Puffer A und 300 mg Poly-Adenin zur Entfernung PCR-hemmender Huminsäuren wurde der

Tab. 2: Zur DNA-Isolierung verwendete Originalproben aus dem Bestand des Lehrstuhls für Mikrobiologie, Universität Regensburg.

Probe	Herkunft der Originalprobe	Terrestrisch/ marin	Temperatur der Probennahmestelle	pH
OP9	Obsidian Pool; Yellowstone Nationalpark; USA	terrestrisch	85°C	6,0
CU1	Uzon Caldera; Kamtschatka	terrestrisch	85°C	5,5
CU4	Uzon Caldera; Kamtschatka	terrestrisch	101°C	5,5
CU7	Uzon Caldera; Kamtschatka	terrestrisch	81 – 98°C	5,5
M1	Malkinski; Kamtschatka	terrestrisch	77°C	8,5
FJ13	Nakama, Fiji-Inseln	terrestrisch	94°C	6,0
CH5	Thermas de Jurasí; Chile	terrestrisch	62°C	6,5
CH9	Thermas de Jurasí; Chile	terrestrisch	55°C	6,5
CH10	Puchuldiza Geysirfeld; Chile	terrestrisch	84°C	8,0
CH11	Puchuldiza Geysirfeld; Chile	terrestrisch	86°C	7,5
TO1*	Tatio-Vulkan; Chile	terrestrisch	86°C	6,5
TO4	Tatio-Vulkan; Chile	terrestrisch	72 - 87°C	6,5
TO8	Tatio-Vulkan; Chile	terrestrisch	75°C	5,5
ED9	Lihir; Papua Neu Guinea	marin	70 – 85°C	7,0
ED10	Lihir; Papua Neu Guinea	marin	97°C	8,0
ED12	Lihir; Papua Neu Guinea	marin	78°C	7,0
ED13	Lihir; Papua Neu Guinea	marin	80°C	7,0
ED14	Lihir; Papua Neu Guinea	marin	82°C	7,0
ED15	Lihir; Papua Neu Guinea	marin	77°C	7,0
LPC33	Ost-Pazifischer Rücken; N 9°, W 104°; Black Smoker Fragment	marin	keine Angabe	6,5
LPC37	Ost-Pazifischer Rücken; N 9°, W 104°; Black Smoker Fragment	marin	keine Angabe	6,5
NA18	Guaymas Becken; N 20°, W 109°; Sediment Bohrkern	marin	55 – 96°C	7,5
NA51	Guaymas Becken; N 20°, W 109°; Black Smoker Fragment	marin	keine Angabe	6,5
NA61a	Guaymas Becken; N 20°, W 109°; Black Smoker Fragment	marin	keine Angabe	6,5
VL3	Vulcano; Italien	marin	80°C	6,5
VL18	Vulcano; Italien	marin	75 – 90°C	6,5

Ansatz für 1 h bei 37°C geschüttelt. Anschließend wurden 8 ml Puffer B und 10 mg Proteinase K zugegeben, und für 1 h im Wasserbad bei 65°C unter gelegentlichem Invertieren inkubiert. Zur vollständigen Zellyse wurde der Ansatz dreimal bei -70°C eingefroren und im Wasserbad bei 55°C aufgetaut. Zur DNA Isolierung wurde der Ansatz in ein PhaseLock-Falcontube (PhaseLockGel™ Light, 50 ml, Eppendorf, Hamburg) überführt und mit 15 ml Phenol ausgeschüttelt. Zur Phasentrennung wurde 10 min. bei 4000 Upm zentrifugiert (Labofuge 400R mit Ausschwingrotor 8179, Heraeus, Osterode). Die obere wässrige Phase wurde abgezogen und mit 1 Vol. Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1) und zuletzt mit 1 Vol. Chloroform/Isoamylalkohol (24:1) ausgeschüttelt.

Abschließend wurde die wässrige Phase in ein frisches 50 ml Falcontube überführt und mit 0,8 Vol. Isopropanol und 1/10 Vol. 1M Natriumacetat-Lösung versetzt. Nach Fällung der DNA über Nacht bei -20°C wurde diese für 1 h bei 4000 Upm und 4°C zentrifugiert (Labofuge 400R mit Ausschwingrotor 8179, Heraeus), und mit 15 ml eiskaltem 70%-igem Ethanol gewaschen. Der Niederschlag wurde im Exsikkator getrocknet und in ca. 20 µl H₂O_{bidest} gelöst.

6.1.2. Quantifizierung von DNA

6.1.2.1. Konzentrationsbestimmung auf Ethidiumbromidplatten

Auf eine Ethidiumbromidplatte (Platten aus 1%-iger Agarose in TE-Puffer (10 mM Tris/HCl pH 8,0; 1 mM EDTA), die 5 µg/ml Ethidiumbromid enthalten) wurden DNA-Mengenstandards bekannter Konzentration (6,25 / 12,5 / 25 / 50 / 100 ng/µl) aufgetragen, und parallel dazu 1 µl der zu bestimmenden DNA. Durch Vergleich der Fluoreszenzstärken im UV-Licht konnte die Konzentration der DNA-Probe abgeschätzt werden.

6.1.2.2. Photometrische Konzentrationsbestimmung

Von der zu bestimmenden DNA-Lösung wurde eine 1:20 Verdünnung in H₂O_{bidest} hergestellt, und mit dem Photometer (DU-640, Beckman, München) die optische Dichte bei 260 nm gegen Wasser gemessen. Der erhaltene Wert entspricht dabei direkt der Konzentration der unverdünnten DNA-Lösung in µg/µl.

Durch Absorptionsmessung bei 280 nm und Berechnung des Verhältnisses OD₂₆₀/OD₂₈₀ waren Rückschlüsse auf die Reinheit der Nukleinsäurelösungen möglich; bei einer reinen DNA-Lösung beträgt das Verhältnis OD₂₆₀/OD₂₈₀ 1,8 (Lottspeich und Zorbas, 1998).

6.1.3. Agarosegelelektrophorese

6.1.3.1. Puffer und Lösungen

<u>TAE-Puffer:</u>	Tris/Acetat pH 8,3	40 mM
	Na ₂ EDTA pH 8,0	1 mM
<u>Auftragspuffer:</u>	Na ₂ EDTA pH 8,0	50 mM
	Harnstoff	4 M
	Saccharose	50% (w/v)
	Bromphenolblau	0,1% (w/v)

6.1.3.2. Gelelektrophorese

Die Analyse von PCR-Produkten, Plasmiden und genomischer DNA erfolgte auf 0,8-1,5%-igen Agarosegelen. Die Agarose wurde in TAE-Puffer aufgeköcht, nach dem Abkühlen mit 0,01% (v/v) Ethidiumbromidlösung (10 mg/ml) versetzt und in eine horizontale Gelkammer (35 ml: 7 x 10 cm oder 280 ml: 20 x 21,5 cm) gegossen.

Um DNA aus Umweltproben von Huminsäuren zu reinigen, wurden 0,8%-ige Low-Meltingpoint-Agarosegele (Serva, Heidelberg), die mit 35 µg Ethidiumbromid versetzt waren, verwendet. Nach elektrophoretischer Auftrennung wurde die unter dem UV-Schirm (Herolab, Wiesloch) sichtbare DNA mit einem sterilen Skalpell ausgeschnitten und nach Aufschmelzen der Agarose bei 65°C direkt in die PCR eingesetzt.

Für Gele, bei denen die DNA auf eine Nylonmembran geblottet werden sollte, wurde SeaKem ME Agarose (Biozym, Oldendorf) verwendet. Die Gele wurden ohne Zugabe von Ethidiumbromid gegossen und nach beendeter Elektrophorese 30 min. in einem Ethidiumbromidbad (0,5 mg in 500 ml H₂O_{bidest}) gefärbt und anschließend 30 min. in H₂O_{bidest} entfärbt.

Die DNA-Proben wurden vor dem Auftragen mit 1/5 Vol. Auftragspuffer versetzt. Der Gellauf erfolgte bei 80-120 V für 30-90 min. in TAE-Puffer. Bei Gelen mit 280 ml Volumen, auf denen restriktionsverdaut, chromosomale DNA aufgetrennt wurde, erfolgte der Gellauf bei 50 V für 12-15 Stunden.

Die Auftrennung der DNA wurde auf einem UV-Leuchtschirm mit Hilfe des EasyStore Imaging Systems (Herolab, Wiesloch) dokumentiert.

6.1.4. Isolierung von DNA aus Agarosegelen

Zur Isolierung von Restriktionsfragmenten wurden die Restriktionsansätze elektrophoretisch in einem 1%-igen Agarosegel aufgetrennt, und die gewünschten Banden unter UV-Licht ausgeschnitten. Die Isolierung der DNA aus den Agaroseblöckchen erfolgte mit Hilfe des QIAquick Gel Extraction Kits (Qiagen, Hilden) nach Anleitung des Herstellers.

6.2. Restriktionshydrolyse

Die Spaltung doppelsträngiger DNA mittels Restriktionsendonukleasen erfolgte für ein bis drei Stunden bei der für das jeweilige Enzym erforderlichen Temperatur und in dem vom Hersteller mitgelieferten Puffer.

6.3. Ligation von DNA-Fragmenten

Das zu klonierende DNA-Fragment und der mit kompatiblen Restriktionsendonukleasen linearisierte Vektor wurden in einem Verhältnis von etwa 1:1 in 1x Ligase-Puffer (Roche, Mannheim) gemischt und mit 1 U T4-DNA-Ligase (Roche) pro μl Ansatz versetzt. Die Ligation erfolgte ÜN bei 16°C.

6.4. Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)

6.4.1. Standard-PCR

PCR nach Saiki *et al.* (Saiki et al., 1985; Saiki et al., 1988) wurde in 0,2 ml Reaktionsgefäßen (Roth, Karlsruhe) in einem Thermocycler der Firma ThermoDux (Progene-02; Thermo-DUX, Wertheim) durchgeführt. Um Kontaminationen zu vermeiden, wurden die Reaktionsansätze mit speziellen Pipettenspitzen mit Filtereinsatz (Abimed, Langenfeld) pipettiert.

Im Standardreaktionsansatz (50 μl) waren enthalten: 1x PCR-Puffer I (Roche, Mannheim), 4x 2,5 nmol Desoxynukleosidtriphosphate (dATP, dGTP, dCTP, dTTP), je 10 pmol Vorwärts- und Rückwärtsprimer, 0,1-20 ng Template DNA und 1,25 U Taq-Polymerase (AmpliTaq, Roche).

Zur Amplifikation wurde folgendes Thermocycler-Programm verwendet:

Denaturierung		94°C	90 sek
35 Zyklen:	Denaturierung	94°C	1 min
	Annealing	60°C	1 min
	Synthese	72°C	2 min
Synthese		72°C	10 min

6.4.2. Aufreinigung von PCR-Produkten

Um den PCR-Ansatz von restlichen Primern, Nukleotiden und Taq-Polymerase zu reinigen und zugleich das PCR-Produkt aufzukonzentrieren, wurde der QIAquick PCR-Purification Kit (Qiagen, Hilden) nach den Angaben des Herstellers verwendet.

6.4.3. Ligation von PCR-Produkten

Gereinigte PCR-Produkte wurden in den Vektor pDRIVE (Qiagen, Hilden) ligiert, der für die durch die Taq-Polymerase hervorgerufenen 3'-A-Überhänge komplementäre 5'-U-Überhänge bereitstellt. Die Ligation erfolgte entsprechend den Herstellerangaben für 30 min. bei 4°C. Anschließend wurde der Ligationsansatz in einen kompetenten *E. coli* Stamm (QIAGEN EZ, Qiagen, Hilden) transformiert, wobei der pDRIVE Vektor die Identifikation positiver Klone mittels Blau/Weiß-Screening auf IPTG/X-GAL-Platten erlaubt.

6.4.4. Einführung von Restriktionsschnittstellen

Zur Konstruktion von Expressionsklonen mussten DNA-Fragmente in einem definierten Leseraster in entsprechende Expressionsvektoren eingesetzt werden. Hierbei war es notwendig, neue Restriktionsschnittstellen am 5'- und 3'-Ende des Protein-codierenden DNA-Abschnitts einzuführen. Zu diesem Zweck wurden Primer verwendet, die die gewünschte Restriktionsschnittstelle im richtigen Leseraster enthielten (siehe Tab. 1). Die in derartige Vektorkonstrukte eingefügten PCR-Produkte wurden sequenziert, um eventuell durch die Taq-Polymerase erzeugte Basenaustausche auszuschließen.

6.5. Klonierung und Plasmidpräparation

6.5.1. Herstellung kompetenter Zellen

6.5.1.1. Puffer und Lösungen

<u>SOB-Medium:</u>	Bacto-Trypton	20 g
	Hefeextrakt	5 g
	NaCl	0,58 g
	KCl	0,19 g
	H ₂ O _{bidest}	ad 1000 ml

<u>50-fach SOC-Lösung:</u>	Glukose	3,96 g
	MgSO ₄ x 7 H ₂ O	2,46 g
	MgCl ₂ x 6 H ₂ O	2,03 g
	H ₂ O _{bidest}	ad 20 ml

<u>Trafo-Puffer I:</u>	Rubidiumchlorid	6 g
	MnCl ₂ x 4 H ₂ O	4,95 g
	KAc	1,47 g
	CaCl ₂ x 2 H ₂ O	0,75 g
	Glycerin	75 g
	H ₂ O _{bidest}	ad 500 ml
	mit Essigsäure auf pH 5,8 einstellen	

<u>Trafo-Puffer II:</u>	MOPS (0,5M)	4 ml
	Rubidiumchlorid	0,24 g
	CaCl ₂ x 2 H ₂ O	2,2 g
	Glycerin	30 g
	H ₂ O _{bidest}	ad 200 ml
	mit Natronlauge auf pH 6,8 einstellen	

6.5.1.2. Durchführung

E. coli-Zellen wurden mit Rubidiumchlorid für die Aufnahme von DNA kompetent gemacht (Hannahan, 1983). Dazu wurden 2 ml einer ÜN gewachsenen Kultur in der Tischzentrifuge abzentrifugiert, in 100 ml SOB- und 2 ml 50x SOC-Lösung aufgenommen und bei 37°C unter Schütteln inkubiert. Bei einer OD₆₀₀ von 0,4 wurde die Kultur 15 min. auf Eis abgekühlt und anschließend 5 min. bei 6500 Upm und 4°C abzentrifugiert (SS34-Rotor, Sorvall Superspeed RC2-B). Der Zelleniederschlag wurde in 11,4 ml kaltem Trafo-Puffer I resuspendiert, erneut 5 min. bei 6500 Upm und 4°C zentrifugiert (SS34-Rotor, Sorvall Superspeed RC2-B) und anschließend in 2,9 ml eisgekühltem Trafo-Puffer II aufgenommen. Die nun kompetenten Zellen wurden in 50 µl Aliquots portioniert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -70°C aufbewahrt.

6.5.2. Transformation von *E. coli*

50 µl kompetente Zellen wurden auf Eis aufgetaut, mit 1 bis 3 µl Ligationsansatz vermischt und für 30 min. auf Eis gekühlt. Nach anschließendem Hitzeschock für 90 sek. bei 42°C wurden die Zellen nochmals für 5 min. auf Eis gestellt, dann mit 800 µl 37°C warmen LB-Medium versetzt und für 45 min. bei 37°C inkubiert. Die nun transformierten Zellen wurden 3 min. abzentrifugiert (13000 Upm., Tischzentrifuge), der Zelleniederschlag in 100 µl LB-Medium resuspendiert und nach Auftragen von 100 µl Ampicillinlösung (10 µg/ml) auf einer LB-Platte ausplattiert. Bei Plasmiden mit *lacZ'* konnten positive Transformanden mittels Blau/Weiß-Screening identifiziert werden. Dazu wurde der Transformationsansatz auf LB-Platten ausplattiert, auf die zuvor 10 µl Ampicillin (100 mg/ml), 10 µl IPTG (100 mM) und 50 µl X-GAL (40 mg/ml, gelöst in Formamid) aufgebracht wurde. Die Inkubation der Platten erfolgte über Nacht bei 37°C. Gewachsene Klone wurden steril in 10 ml Flüssigmedium (LB-Medium mit 10 µl Ampicillinlösung (100 µg/ml)) überimpft und ÜN im Rollerdrum bei 37°C schüttelnd inkubiert.

6.5.3. Plasmidpräparation

Zur Plasmidisolierung wurden 2 ml *E. coli* ÜN-Kultur in einem Eppendorfreaktionsgefäß abzentrifugiert (Tischzentrifuge, 13000 Upm, 5 min, 4°C). Für den Zellaufschluss und die Plasmidaufreinigung wurde der QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen, Hilden) nach Angaben

des Herstellers verwendet. Die Plasmid-DNA wurde mit 100 μl $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$ von den Zentrifugensäulchen eluiert, und die DNA-Konzentration photometrisch bestimmt.

6.6. Sequenzierung von PCR-Produkten und Plasmid-DNA

Sequenzierungen wurden von der Firma GATC GmbH in Koblenz mit einem ABI 377 HAT DNA-Sequenziergerät nach der Kettenabbruchmethode (Sanger et al., 1977) durchgeführt. Zur Sequenzierung wurden DNA Mengen von 1 $\mu\text{g}/\text{kb}$ bei Plasmiden bzw. 0,5 $\mu\text{g}/\text{kb}$ bei PCR-Fragmenten sowie 50 pMol Primer als Aliquot mit 10 pMol/ μl in $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$ benötigt.

6.7. Pulsfeldgelelektrophorese (PFGE)

6.7.1. Puffer und Lösungen

<u>0,5x TBE-Puffer:</u>	Tris	45 mM
	Borat	45 mM
	EDTA	1 mM
	immer frisch herstellen	
<u>PIV-Puffer:</u>	Tris/HCl pH 7,5	10 mM
	NaCl	1 mM
<u>EC-Lyse-Puffer :</u>	Tris	6 mM
	NaCl	1 mM
	Na_2 -EDTA	0,1 M
	Brij 58	0,5% (w/v)
	Desoxycholat	0,2% (w/v)
	N-Lauroyl-Sarkosin	0,5% (w/v)

Der pH-Wert wurde mit 5N NaOH auf 8,0 eingestellt.

<u>ESP-Puffer:</u>	Na ₂ -EDTA pH 9,0	0,5 M
	N-Lauroyl-Sarkosin	1% (w/v)

Vor Verwendung des Puffers wurde 1,0 mg/ml Proteinase K zugegeben.

<u>TE-Puffer:</u>	Tris/HCl pH 7,5	10 mM
	EDTA	1 mM

6.7.2. Präparation der DNA im Agaroseblöckchen

Über differenzielle Zentrifugation angereicherte *N. equitans*-Zellen (siehe II.4.3) wurden 15 min bei 13000 Upm in der Tischzentrifuge bei 4°C sedimentiert. Der Zelleniederschlag wurde einmal in PIV-Puffer gewaschen und anschließend in PIV-Puffer bis zu einer Endkonzentration von 4×10^9 Zellen/ml aufgenommen. Die Zellsuspension wurde mit dem gleichen Volumen InCert-Agarose (1,6% in H₂O_{bidest}) vermischt und in 100 µl-Förmchen (Plug Molds, Biorad, München) gegossen.

Für die folgenden Inkubationsschritte wurden die Agaroseblöckchen in eine Serumflasche überführt. Die Zellyse erfolgte in 10 ml EC-Lyse-Puffer ÜN bei 37°C unter leichtem Schütteln. Proteine wurden größtenteils durch zweistündige Inkubation in 10 ml ESP-Puffer bei 50°C entfernt. Anschließend wurden die Blöckchen dreimal für jeweils 30 min. in 15 ml TE-Puffer bei 37°C gewaschen. Beim zweiten Waschschrift wurde zusätzlich 0,1 mg/ml PMSF zur Hemmung der Proteinase K zugegeben. Histone wurden durch Inkubation in 3 M KCl bei 50°C ÜN entfernt. Um die Kaliumionen, die im nachfolgenden Inkubationsschritt mit N-Lauroyl-Sarkosin komplexieren können, zu entfernen, wurden die Blöckchen für jeweils 3 h bei 50°C in 3 M, 1 M, und 0,3 M NaCl-Lösung gewaschen. Nach 30-minütigem Waschen in 15 ml TE-Puffer bei 37°C wurden die restlichen Proteine durch Inkubation in ESP-Puffer bei 50°C ÜN entfernt. Abschließend wurden die Blöckchen dreimal 30 min. in 15 ml TE-Puffer bei 37°C gewaschen (im zweiten Waschschrift wurde 0,1 mg/ml PMSF zugegeben) und in TE-Puffer bei 4°C aufbewahrt.

6.7.3. Restriktionshydrolyse

Die in den Agaroseblöckchen eingebettete DNA wurde mit Hilfe von Restriktionsendonukleasen geschnitten. Die Hydrolyse erfolgte ÜN nach Zugabe von 60 Units Enzym in 350 µl des zugehörigen 1x Puffers bei der vom Hersteller angegebenen Temperatur. Abschließend wurden die Blöckchen für 1 h in 1 ml TE-Puffer gewaschen.

6.7.4. Durchführung der PFGE

Die DNA-haltigen Agaroseblöckchen wurden in die Taschen eines 1%-igen Agarosegels (FastLane-Agarose, Biozym, Oldendorf) überführt. Die Bedingungen für die Elektrophorese wurden mit Hilfe der ChefMapper Software (BioRad, München) ermittelt. Laufzeit und Switch Times wurden, den Angaben des Herstellers zur Verwendung von FastLane-Agarose entsprechend, um 20% verkürzt.

Laufbedingungen Trennbereich 10 – 600 kb:

Winkel:	120°
Initial Switch Time	0,38 s
Final Switch Time	43,3 s
Dauer	16 h

Die PFGE wurde in einer Chef DR III Apparatur (BioRad, München) bei 4°C mit 2 l 0,25x TBE als Laufpuffer durchgeführt. Nach dem Lauf wurde das Gel in 500 ml TBE-Puffer, dem 500 µg Ethidiumbromid zugesetzt wurden, für 30 min gefärbt und für 30 min. in TBE-Puffer entfärbt. Die Dokumentation erfolgte mit dem EasyStore Imaging System (Herolab, Wiesloch).

6.8. Nachweis von 16S rRNA Genen in restriktionsverdauter DNA

6.8.1. Puffer und Lösungen

<u>Denaturierungs-Puffer:</u>	NaCl	1,5 M
	NaOH	0,5 M
<u>Neutralisierungs-Puffer:</u>	NaCl	1,5 M
	Tris/HCl pH 8	1M
<u>20x SSC:</u>	NaCl	3,0 M
	Na ₃ Citrat	0,3 M
<u>Puffer 1:</u>	Maleinsäure	0,1 M
	NaCl	0,15 M
	pH mit NaOH-Plätzchen auf 7,5 einstellen	
<u>Puffer 2:</u> (Blocking-Puffer)	10x Blocking-Reagenz	10% (w/v) in Puffer 1
<u>Puffer 3:</u> (Detection-Puffer)	Tris/HCl pH 9,5	0,1 M
	NaCl	0,1 M
	MgCl ₂	50 mM
<u>Waschpuffer:</u>	Tween 20	0,3% (v/v) in Puffer 1
<u>TE-Puffer:</u>	Tris/HCl pH 8	10 mM
	EDTA	1 mM

6.8.2. Herstellung einer DIG-markierten DNA-Sonde

Zur Herstellung einer DIG-markierten 16S rRNA Gen-Sonde wurden zu einem standardmäßigen 50 µl PCR-Ansatz zusätzlich 4 µl DIG-11-dUTP (1mM) zugegeben. Als Matrize diente ein gereinigtes Plasmid (pAMP1), das als Insertion einen Teil des 16S rRNA Gens von *Metallosphaera sedula* enthielt. Zur Amplifikation wurden die Primer 519uF und 1119aR verwendet. Das PCR-Produkt wurde gereinigt, und anschließend der DIG-Gehalt mit Hilfe von DIG Quantification Teststrips (Boehringer, Mannheim) nach Vorschrift des Herstellers bestimmt.

Vor dem ersten Gebrauch wurde die Sonde im Wasserbad bei 100°C für 5 min. vollständig denaturiert und dann in Eiswasser schnell abgekühlt. Anschließend wurde zu 5 ml Hybridisierungspuffer DIG Easy Hyb (Boehringer, Mannheim) soviel Sonde zugegeben, dass die Digoxigenininkonzentration 20 ng/ml betrug. Die Sonde wurde bei -20°C gelagert und für mehrere Hybridisierungen verwendet. Vor jedem erneuten Gebrauch wurde die Sonde 10 min. bei 68°C denaturiert.

6.8.3. Transfer restriktionsverdauter DNA auf Nylonmembranen (Southern Blot)

Die restriktionsverdaute DNA wurde in einem 1%-igen SeaKem-Agarosegel aufgetrennt und nach Färbung im Ethidiumbromidbad (0,5 mg/ 500 ml H₂O_{bidest}) auf dem UV-Schirm fotografiert.

Um den DNA-Transfer aus dem Gel zu ermöglichen, wurde das Gel in einer GS Gene LinkerTM UV Chamber (Bio-Rad, Richmond; USA) mit UV-Licht (60 mJ) bestrahlt, und dadurch Strangbrüche in die DNA eingefügt. Dann wurde das Gel 30 min. in Denaturierungspuffer und anschließend weitere 30 min. in Neutralisierungspuffer inkubiert. Zwischenzeitlich wurden eine positiv geladene Nylonmembran (Amersham, Braunschweig) und 6 Whatman-Filter (3 MM) auf die Größe des Gels zurechtgeschnitten und in 2x SSC äquilibriert. Anschließend wurden die DNA-Fragmente mit einer PosiBlot 10-30 Apparatur (Stratagene, Heidelberg) auf die Nylonmembran transferiert. Nach abgeschlossenem Transfer wurde die Lage der Geltaschen auf der Nylonmembran markiert, und die Membran kurz in 6x SSC gewaschen. In der GS Gene LinkerTM UV Chamber (Bio-Rad, Richmond; USA) wurde abschließend die transferierte DNA mit 150 mJ an die noch feuchte Membran fixiert. Die trockene Membran konnte bei 4°C aufbewahrt werden.

6.8.4. DNA-Hybridisierung mit der DIG-markierten Sonde

Die Nylonmembran wurde zunächst in 20 ml DIG Easy Hyb (Boehringer, Mannheim) unter Rotation in einem Hybridisierungsschrank (OV 5, Biometra; Göttingen) bei 42°C vorinkubiert. Nach 30 min. wurde die Vorhybridisierungslösung verworfen und durch 10 ml Hybridisierungslösung ersetzt, welche die DIG-markierte Oligosonde enthielt. Die Hybridisierung erfolgte ÜN oder für mindestens vier Stunden unter Rotation im Hybridisierungsschrank bei 42°C.

Um unspezifisch gebundene Sonde zu entfernen, wurde die Membran zunächst zweimal 5 min. in 2x SSC mit 0,1% SDS bei 42°C gewaschen. Anschließend folgten zwei stringentere Waschungen von jeweils 15 min. in 0,5x SSC mit 0,1% SDS bei 65°C. Nach kurzem Spülen mit Waschpuffer wurde die Membran 30 min. in Puffer 2 abgesättigt. Dann wurde der Puffer abgegossen und durch 20 ml frischen Blocking-Puffer ersetzt, dem 4 µl Anti-DIG-Antikörperkonjugat (Boehringer, Mannheim) zupipettiert waren. Nach 60 min. Inkubation wurden nicht gebundene Antikörper durch zweimal 15-minütiges Schütteln in Waschpuffer entfernt. Anschließend wurde die Membran 5 min. in Puffer 3 äquilibriert.

6.8.5. Colorimetrischer Nachweis DIG-markierter DNA

Zur colorimetrischen Detektion DIG-markierter DNA wurde die Membran mit 20 ml Puffer 3 überschichtet, zu dem 90 µl NBT und 70 µl BCIP gemischt wurden. Die Membran wurde 30 bis 90 min. erschütterungsfrei im Dunkeln inkubiert. Durch fünfminütiges Einlegen der Membran in TE-Puffer konnte die Farbreaktion abgestoppt werden.

6.9. Ganzzellhybridisierung

6.9.1. Puffer und Lösungen

<u>Phosphat-Puffer:</u>	$\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$	0,2 M
	pH 7,2	

Es wurden jeweils 0,2-molare Lösungen hergestellt und bis zu einem pH Wert von 7,2 gegeneinander titriert.

<u>3x PBS-Puffer:</u>	NaCl	390 mM
	Phosphat-Puffer pH 7,2	30 mM

<u>30%-ige Fixierlösung:</u>	Paraformaldehyd	3,3 g
	$\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$	6,6 ml
	5 N NaOH	30 μl

Nach ca. 30-minütigem Rühren bei 60°C ist der Paraformaldehyd gelöst.

	3x PBS-Puffer	3,3 ml
	2 M HCl	36 μl

Der pH Wert wurde mit 2 M HCl auf 7,2 eingestellt. Nach Abfiltration ungelöster Bestandteile war die Fixierlösung gebrauchsfertig und konnte, nach Lagerung bei 4°C, ca. 48 h verwendet werden.

<u>Gelatine-Lösung:</u>	Gelatine	0,1% (w/v)
	$\text{KCr}(\text{SO}_4)_2$	0,01% (w/v)

Formamidlösung: Zur Entionisierung von 100 ml Formamidlösung wurden 5 g Serdolit (MB-1) zugegeben und in einem abgedunkelten Becherglas für 1 h bei RT gerührt. Nach Abfiltrieren wurde das entionisierte Formamid portioniert und bei -20°C aufbewahrt.

<u>Hybridisierungspuffer:</u>	NaCl	0,9 M
	Tris/HCl, pH 7,2	0,01 M
	SDS	0,001-0,1% (w/v)
	Formamidlösung	0-40% (v/v)

<u>Waschpuffer:</u>	NaCl	0,06-0,9 M
	Tris/HCl, pH 7,2	0,01 M
	SDS	0,001-0,1% (w/v)

Die NaCl-Konzentration wurde entsprechend der Formamidmenge im Hybridisierungspuffer eingestellt. Als Anhaltspunkt dienen die Werte der folgenden Tabelle:

Formamid im Hybridisierungspuffer:	0%	10%	20%	30%	40%
NaCl im Waschpuffer:	0,9 M	0,45M	0,18 M	0,11 M	0,06 M

6.9.2. Beschichtung der Objektträger

Die mit Epoxidharz beschichteten Objektträger (6 Felder, Ø 8 mm, Paul Marienfeld KG, Bad Mergentheim) wurden in Spülmittellösung entfettet, gründlich mit entionisiertem Wasser gewaschen und getrocknet. Die Beschichtung erfolgte durch kurzes Eintauchen in die auf 70°C erwärmte Gelatine-Lösung (Amann et al., 1990). Nach Trocknung bei RT waren die Objektträger gebrauchsfertig.

6.9.3. Fixieren der Zellen

1 ml logarithmische Zellsuspension wurde mit 1/10 Volumen 30%-iger Fixierlösung versetzt und für 1 h bei RT inkubiert. Anschließend wurden die Zellen 15 min. bei 13000 Upm und 4°C in der Tischzentrifuge sedimentiert. Bei schwefelhaltigen Kulturen wurde zuvor der größte Teil des Schwefels durch kurzes Anzentrifugieren bei 1000 Upm entfernt. Das Zellsediment wurde zweimal in 1 ml PBS-Puffer (1x) gewaschen (13000 Upm, 15 min., 4°C, Tischzentrifuge). Danach wurde mit PBS-Puffer (1x)/Ethanol_{abs} (1:1, v/v) die gewünschte Zelldichte (ca. 10^8 Zellen/ml) eingestellt. Die fixierten Zellen wurden bei -20°C aufbewahrt.

6.9.4. Aufbringen der Zellen auf Objektträger

Je 3 µl der fixierten Zellen wurden auf die vertieften Felder der Objektträger aufgebracht, und diese dann für 10 min. bei 46°C getrocknet. Anschließend erfolgte eine Dehydratisierung und Nachfixierung der Zellen in einer aufsteigenden Ethanolreihe (je 3 min. in 50%, 80%, und 96% Ethanol, v/v).

6.9.5. Hybridisierung

Die optimalen Hybridisierungsbedingungen wurden für jede verwendete DNA-Oligonukleotidsonde spezifisch eingestellt. Die Stabilität der Bindung des Oligonukleotids an der RNA-Zielsequenz hängt von der Schmelztemperatur T_M der Sonde sowie von der Formamidkonzentration im Hybridisierungspuffer und dem Salzgehalt des Waschpuffers ab. Alle Hybridisierungen wurden bei 46°C durchgeführt, so dass die die Formamidkonzentration für die jeweilige Sonde nach folgender empirischer Formel (Lathé, 1985; Sambrook, 1989; modifiziert) näherungsweise ermittelt werden konnte:

$$T_M = 81,5 + 16,6 \log M + 0,4 (\% \text{ G+C}) - 820/n - 0,5 (\% \text{ Formamid})$$

T_M = Schmelztemperatur in °C

M = Konzentration an monovalenten Kationen im Hybridisierungspuffer in mol l⁻¹

n = Anzahl der Nukleotide der Sonde

Die Salzkonzentration im Waschpuffer wurde für jede Sonde spezifisch optimiert. Durch SDS-Zusatz zum Hybridisierungspuffer wurden die fixierten Zellen für die Sondenpenetration permeabilisiert.

Für die Ganzzellhybridisierung (Amann et al., 1990) wurden die auf den Objektträgern fixierten Zellen mit 8 µl Hybridisierungslösung überschichtet und in einem verschlossenen 50 ml Falcon-Röhrchen, welches ein mit Waschpuffer getränktes Zellstofftuch enthielt, bei 46°C (Hybridisierungsöfen OV5, Biometra, Göttingen) inkubiert. Nach 15-minütiger Vorhybridisierung wurden auf einem 37°C warmen Heizblock je 1 µl der gewünschten Sondenlösungen (50 ng/µl) schnellstmöglich zugegeben, vorsichtig gemischt und weitere 2 h bei 46°C inkubiert. Anschließend wurden die Objektträger mit 48°C warmen Waschpuffer abgespült und für 15 min. in 45 ml vorgewärmten Waschpuffer bei 48°C unter leichtem Schütteln gewaschen. Nach Spülen der Objektträger in entionisiertem Wasser wurden die Zellen auf den getrockneten Objektträgern in Citifluor AF1-Lösung eingebettet, um schnelles Verblässen des Fluoreszenzfarbstoffes zu vermeiden.

7. Proteinchemische Methoden

7.1. Expression von rekombinantem Protein in *E. coli*

7.1.1. Verwendete Expressionssysteme

Zur Expression von rekombinantem PolN und PolC wurde das pET Vektor-System (Novagen, Madison, USA) verwendet. Hierbei wird das zu exprimierende Fremdgen unter die transkriptionelle Kontrolle des T7-Promotors kloniert, der von T7-RNA-Polymerase (T7-RNAP) erkannt wird. Transformiert wurde in die *E. coli* Stämme BL21 (DE3) oder RosettaTM, die das Gen für die T7-RNAP unter der transkriptionellen Kontrolle des *lac*-UV5 Promotors chromosomal codieren. Durch Zugabe von IPTG ins Medium kann somit die Expression von T7-RNAP induziert werden, was wiederum die Expression des eingeschleusten Fremdgens zur Folge hat. Zusätzlich trägt der RosettaTM-Stamm ein Plasmid mit Genen, die für in *E. coli* seltene tRNA-Spezies (AGG, AGA, AUA, CUA, CCC und GGA) codieren, wodurch die Expression von rekombinantem Protein verbessert werden kann. Zur Expression von PolN und PolC wurden die Vektoren pET16b bzw. pET25b verwendet, bei denen dem rekombinanten Protein N-terminal (pET16b) bzw. C-terminal (pET25b) ein His-tag, bestehend aus 6 Histidinresten angefügt wird. Durch die hohe Affinität des His-tags zu Ni²⁺-NTA (selbst in Gegenwart von 8 M Harnstoff), wird eine stringente Reinigung des Fusionsproteins, auch unter denaturierenden Bedingungen ermöglicht. Die Elution von gebundenem Protein von der Ni²⁺-NTA-Säule erfolgt mittels kompetitiver Verdrängung durch 100 bis 500 mM des Histidin-Analogons Imidazol. Zusätzlich wird durch gegen den His-tag gerichtete Antikörper eine rasche immunologische Detektion des Fusionsproteins ermöglicht.

7.1.2. Durchführung der Proteinexpression

Zur Expression von PolN und PolC wurden 500 ml LB Medium mit 100 µg/ml Ampicillin (und bei Verwendung des RosettaTM Stammes zusätzlich mit 34 µg/ml Chloramphenicol) versetzt, mit 10 ml einer Transformanden-ÜN-Kultur beimpft und bei 37°C bis zu einer OD₆₀₀ von 0,6 hochgeschüttelt. Dann wurde durch Zugabe von 1 mM IPTG induziert und zur Genexpression für weitere 16 h bei 25°C schüttelnd inkubiert. Abschließend wurden die Zellen auf 4°C abgekühlt, abzentrifugiert (Sorvall Superspeed RC2-B, GS3-Rotor, 6000 Upm, 15 min, 4°C) und bis zur Proteinisolierung bei -70°C gelagert.

7.2. Reinigung von rekombinantem Protein

3 g gefrorene rekombinante *E. coli* Zellen wurden in 15 ml BugBuster™ Protein Extraction Reagent (Novagen, Madison, USA) resuspendiert, dem zum Abbau von Nucleinsäuren 375 U Benzoase Nuklease (Novagen) zugesetzt wurden. Zur Hemmung unerwünschter Protease-Aktivität wurden dem Ansatz zwei Tabletten Complete Mini, Proteasen-Inhibitoren-Cocktail (Roche, Mannheim) zugegeben. Der Zellaufschluss erfolgte durch einstündiges Schütteln des Ansatzes bei RT. Zellfragmente wurden durch Zentrifugation (Sorvall Superspeed RC2-B, SS34-Rotor, 14000 Upm, 30 min, 4°C) entfernt, und der Proteinüberstand bis zur Weiterverarbeitung auf Eis gelagert.

7.2.1. Reinigung von rekombinantem PolN unter nativen Bedingungen

Binde-Puffer (nativ):

NaH ₂ PO ₄	50 mM
NaCl	300 mM
Imidazol	10 mM
pH mit HCl auf 8,0 einstellen	

Wasch-Puffer (nativ):

NaH ₂ PO ₄	50 mM
NaCl	300 mM
Imidazol	20 mM
pH mit HCl auf 8,0 einstellen	

Elutions-Puffer (nativ):

NaH ₂ PO ₄	50 mM
NaCl	300 mM
Imidazol	250 mM
pH mit HCl auf 8,0 einstellen	

10 ml Proteinüberstand wurden für 45 min. bei 90°C inkubiert, was die Denaturierung und Aggregation des Großteils der hitzelabilen *E. coli*-Proteine bewirkte. Nach dem Entfernen der Proteinaggregate durch Zentrifugation (Sorvall Superspeed RC2-B, SS34-Rotor, 14000 Upm, 30 min, 4°C) wurde der Überstand, der das hitzestabile PolN enthielt, einer Affinitätschromatographie an Ni²⁺-NTA unterworfen. Dazu wurde in einem 15 ml Falcon-Tube 1 ml 50% Ni²⁺-NTA Resin (Novagen, Madison, USA) mit 4 ml Binde-Puffer (nativ) äquilibriert. Nach Sedimentation des Säulenmaterials wurde der Binde-Puffer durch 4 ml

Proteinlösung ersetzt, und für mindestens 1 h bei 4°C schüttelnd inkubiert. Dann wurde das Ni²⁺-NTA auf eine 10 ml-Säule (Novagen) gepackt, und nicht gebundene Proteine durch Waschen mit 8 Säulenvolumen Wasch-Puffer (nativ) entfernt. Die Elution des gebundenen Proteins erfolgte mit 2 ml Elutions-Puffer (nativ). Das Eluat wurde in Fraktionen zu 0,5 ml gesammelt, und diese bei 4°C aufbewahrt.

7.2.2. Reinigung von rekombinantem PolC unter denaturierenden Bedingungen

<u>Binde-Puffer (denaturierend):</u>	NaH ₂ PO ₄	100 mM
	Tris	10 mM
	Harnstoff	7,2 M
	Imidazol	10 mM
	pH 8,0 mit HCl unmittelbar vor Gebrauch einstellen	

<u>Wasch-Puffer (denaturierend):</u>	NaH ₂ PO ₄	100 mM
	Tris	10 mM
	Harnstoff	7,2 M
	Imidazol	20 mM
	pH 8,0 mit HCl unmittelbar vor Gebrauch einstellen	

<u>Elutions-Puffer (denaturierend):</u>	NaH ₂ PO ₄	100 mM
	Tris	10 mM
	Harnstoff	7,2 M
	Imidazol	250 mM
	pH 8,0 mit HCl unmittelbar vor Gebrauch einstellen	

Rekombinantes PolC wurde unter denaturierenden Bedingungen, nach Zugabe von 7,2 M Harnstoff gereinigt. Zur Affinitätschromatographie wurde 1 ml (zuvor mit Binde-Puffer (denaturierend) äquilibriertes) Ni²⁺-NTA mit 6 ml denaturiertem Proteinüberstand gemischt und mindestens 1 h bei RT geschüttelt. Die Säulenchromatographie wurde analog zu II.7.2.1 unter Verwendung von Wasch-Puffer (denaturierend) und Elutions-Puffer (denaturierend) durchgeführt. Die gesammelten Eluat-Fraktionen wurden bei RT aufbewahrt.

7.3. Analyse von Proteinlösungen

7.3.1. Proteinmengen-Bestimmung (Bicincholinsäure-Test)

Der Test wurde nach Anleitung des Herstellers (Sigma-Aldrich, Taufkirchen) durchgeführt. Aliquots der zu untersuchenden Proteinlösung und BSA-Lösungen bekannter Konzentration wurden mit dem fünfzigfachen Volumen einer frischen BCA/CuSO₄-Lösung (50:1) gemischt, 30 min. bei 60°C inkubiert und anschließend bei 562 nm im Photometer (DU-640, Beckman, München) vermessen. Die unbekannt Proteinkonzentrationen wurden anhand der BSA-Eichgeraden ermittelt.

7.3.2. SDS-PAGE nach Laemmli (Laemmli, 1970)

<u>1x Laufpuffer:</u>	Tris	25 mM
	Glycin	250 mM
	SDS	0,1% (w/v)

<u>5x Laemmli-Auftragspuffer:</u>	Tris/HCl pH 8,0	250 mM
	SDS	10% (w/v)
	2-Mercaptoethanol	25% (v/v)
	Glycerin	50% (v/v)
	Bromphenolblau	0,5% (w/v)

Gellösungen für SDS-Polyacrylamidgele:

	3% Sammelgel	8% Trenngel	10% Trenngel
1 M Tris pH 8,8	-	11,5 ml	11,5
1 M Tris pH 6,8	3,32 ml	-	-
H ₂ O _{bide} st	2,4 ml	10,5 ml	8,5 ml
Acrylamid-Bis-Lösung (37,5 : 1)	880 µl	8 ml	10 ml
10% SDS	66 µl	300 µl	300 µl
TEMED	5 µl	15 µl	15 µl
10% APS	50 µl	150 µl	150 µl

Zur elektrophoretischen Auftrennung denaturierter Proteine wurden SDS-Polyacrylamidgele verwendet. Es wurden 8%-ige oder 10%-ige Trenngele (8,5 cm x 6,5 cm, Dicke 1 mm) gegossen. Nach einstündiger Polymerisation wurde ein 3%-iges Sammelgel über das Trenngel geschichtet, und ein Kamm mit 10 Auftragstaschen eingesetzt. Die Proben wurden vor dem Auftragen mit 5x Laemmli-Auftragspuffer versetzt und im Wasserbad für 10 min. aufgekocht. Die Elektrophorese erfolgte bei konstanter Stromstärke (40 mA pro Gel) in einer Mighty Small SE 250 Elektrophorese-Apparatur (Hoefler, San Francisco, USA) unter Wasserkühlung, bis die Bromphenolblau-Bande die untere Gelkante erreicht hatte.

7.3.3. Coomassie-Färbung und Trocknung von SDS-Gelen

<u>Coomassie-Färbelösung:</u>	Coomassie Blau R 250	0,1% (w/v)
	Methanol	30% (v/v)
	Eisessig	10% (v/v)

<u>Entfärbelösung:</u>	Methanol	30% (v/v)
	Eisessig	10% (v/v)

Das Gel wurde mit Färbelösung überschichtet und unter leichtem Schütteln 1 - 3 h gefärbt. Entfärbt wurde unter gleichen Bedingungen, unter mehrmaligem Wechseln des Entfärbers, bis der gewünschte Entfärbungsgrad erreicht war. Anschließend wurde das Gel in H₂O_{bidest} gespült, mittels einer Geltrocknungs-Apparatur (DryGel Sr. SE1160, Hoefler, San Francisco, USA) für 30 min bei 70°C im Vakuum getrocknet und zur Dokumentation mit einem Flachbett-Scanner digitalisiert.

7.4. Western Blot

<u>Transfer-Puffer:</u>	Tris	25 mM
	Glycin	192 mM
	Methanol	20% (v/v)
	pH mit HCl auf 8,3 einstellen	

7.4.1. Transfer von Protein auf PVDF-Membranen

Der Transfer von Protein aus SDS-Polyacrylamidgelen auf PVDF-Membran (Immobilon P, Millipore, Bedford, USA) erfolgte mittels elektrischen Feldes in einer Western-Blot-Apparatur (Trans Blot SD Semi Dry Transfer Cell, Biorad, München) nach Anleitung des Herstellers. Vor dem Blot wurde die Membran für mindestens 1 min. in Methanol p.a. eingelegt. Anschließend wurden Membran, Gel und die benötigten Stücke Whatman 3MM-Filterpapier für 15 min. in Transfer-Puffer äquilibriert. Die Blot-Dauer betrug 1 h bei einer konstanten Spannung von 15 V.

7.4.2. Immunologischer Nachweis

Auf PVDF-Membran transferiertes rekombinantes Protein, das mit einem His-Tag markiert war, wurde mittels His-Tag AP Western Reagents-Kit (Novagen, Madison, USA) immunologisch detektiert. Abweichend vom Protokoll des Herstellers wurde die Membran sofort nach erfolgtem Elektroblot für 1 h bei RT mit Blocking Solution (3% BSA in 1x TBS-Puffer; im Kit enthalten) abgesättigt. Anschließend folgte eine einstündige Inkubation mit einer Lösung des primären Antikörpers (10 µl His-Tag Monoclonal Antibody (Novagen) aus Maus, in 10 ml Blocking Solution). Nach zweimaligem Waschen der Membran in TBS-Puffer und einmaligem Waschen in TBSTT-Puffer (im Kit enthalten) für jeweils 15 min., wurde 1 h mit einer Lösung des sekundären, Alkalische-Phosphatase-gekoppelten Antikörpers (1,6 µl Goat anti-Mouse IgG AP Conjugate (Novagen) in 8 ml Blocking Solution) inkubiert. Anschließend wurde fünfmal 20 min. mit 20 ml TBSTT-Puffer gewaschen.

Die Detektion der markierten Proteinbanden erfolgte colorimetrisch, durch Inkubation der Membran in 15 ml AP-Puffer (im Kit enthalten) mit 60 µl NBT und 60 µl BCIP. Nach dem Sichtbarwerden der Banden wurde die Farbreaktion durch Waschen der Membran in H₂O_{bidest} abgestoppt.

7.5. Aktivitätsbestimmung des *trans*-spleißenden Inteins der *N. equitans* DNA-Polymerase B

<u>Splicing-Puffer:</u>	NaPO ₄	20 mM
	NaCl	500 mM
	EDTA	1mM
	pH mit HCl auf 6,0 einstellen	

Zum Nachweis der *trans*-spleißenden Aktivität der beiden mit PolN und PolC assoziierten Intein-Fragmente wurden 0,5 ml aufgereinigtes PolN (50 mg/ml, in Elutions-Puffer (nativ)) mit 0,5 ml PolC (30 mg/ml, in Elutions-Puffer (denaturierend)) vermischt, sodass die Harnstoffkonzentration im Ansatz 3,6 M betrug. Unter diesen mäßig denaturierenden Bedingungen wurde über Nacht bei 4°C vorinkubiert. Dann wurde der Ansatz durch Zugabe von 9 ml Splicing-Puffer 1:10 verdünnt, und die Reaktion durch Inkubation im Wasserbad bei 37°C gestartet.

7.6. Bestimmung der ATPase Aktivität

Proteinchemische Untersuchungen der ATPase von *N. equitans* wurden im Labor von Prof. Volker Müller an der LMU München unter Anleitung von Astrid Lingl durchgeführt.

7.6.1. Membranpräparation

<u>Lyse-Puffer:</u>	Tris	25 mM
	MgCl ₂	5 mM
	PMSF	0,1 mM
<u>Membran-Puffer:</u>	HEPES	100 mM
	MgCl ₂	5 mM
	Glycerin	10% (v/v)
	PMSF	0,05 mM

1 g aufgereinigte *N. equitans*-Zellen (siehe II.4.3) wurden in 5 ml Lysepuffer suspendiert und in einer French Press (American Instrument Co., Silver Springs, USA) bei 5500 kPa Druck aufgeschlossen. Nach dem Entfernen von Zellfragmenten durch Zentrifugation (Sorvall Superspeed RC2-B, SS34-Rotor, 9000 Upm, 15 min, 4°C) wurden die Membranen durch Ultrazentrifugation (Beckmann Optima LE-80K, SW60-Rotor, 40000 Upm, 1 h, 10°C) pelletiert, in 5 ml Membran-Puffer gewaschen und erneut durch einstündige Ultrazentrifugation pelletiert. Abschließend wurden die Membranen in 1 ml Membran-Puffer aufgenommen und mittels eines Glaspotters (Ochs, Bovenden-Lenglern) homogenisiert. Aliquots des gewaschenen Rohextraktes, der Ultrazentrifugen-Überstände (= Cytoplasma-Fraktion) sowie die gewaschenen Membranen wurden bei 4°C aufbewahrt.

7.6.2. ATPase-Aktivitätstest

<u>Reaktions-Puffer:</u>	Tris	100 mM	
	MES	100 mM	
	MgCl ₂	5 mM	
	NaHSO ₃	40 mM	
	pH mit HCl auf 6,0 einstellen		
<u>AAM-Reagenz:</u>	H ₂ SO ₄	5 N	1 Vol.
	(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ x 4 H ₂ O	10 mM	1 Vol.
	Aceton		2 Vol.

Der Standardtest zur Bestimmung der ATPase-Aktivität erfolgte in Eppendorf-Reaktionsgefäßen, in denen 5 bis 20 µl Enzymlösung mit Reaktionspuffer auf 1070 µl ergänzt wurden. Nach dreiminütiger Vorinkubation bei RT, gefolgt von dreiminütiger Inkubation bei 85°C, wurde die Reaktion durch Zugabe von 28 µl einer 100 mM Na₂-ATP Lösung gestartet. Zum Startzeitpunkt sowie nach 3, 6, 9 und 12 min. wurden jeweils 200 µl des Testansatzes entnommen, und die Reaktion durch sofortiges Mischen mit 40 µl 30%-iger TCA und Eintauchen in Eiswasser gestoppt. Zur Bestimmung der thermischen Hydrolyse des ATPs wurde ein Parallelansatz ohne Zugabe von Enzym auf die gleiche Weise bearbeitet. Zur Bestimmung der Enzymaktivität bei unterschiedlichen pH-Werten wurde der Reaktionsansatz zusätzlich durch Zugabe von 50 mM CAPS gepuffert, und der pH Wert bei 85°C eingestellt. Die Enzymaktivität wurde anhand der Freisetzung anorganischen Phosphats (P_i) bestimmt (Heinonen und Lahti, 1981). Die entnommenen Proben sowie NaH₂PO₄-Lösungen bekannter Konzentration wurden dazu mit 1 ml AAM-Reagenz gemischt und nach zehnminütiger Inkubation im Photometer bei 405 nm vermessen. Anhand der P_i-Eichgeraden konnte die Menge des hydrolysierten ATPs bestimmt werden. Die Einheit (U) für die ATPase-Aktivität wurde definiert als 1 µmol freigesetztes P_i/min; die spezifische ATPase Aktivität der Membranen wurde als 1 U/mg Protein definiert.

8. Auswertung von DNA- und Protein-Sequenzen

8.1. Genom-Annotierung

Die Annotierung des Genoms von *N. equitans* und weiterführende bioinformatische Untersuchungen wurden bei der Firma Diversa Corp. in San Diego in Zusammenarbeit mit Dr. Elisabeth Waters durchgeführt.

Protein-codierende DNA Sequenzen mit einer Länge von 50 oder mehr Basen wurden im Genom von *N. equitans* mit Hilfe der Programme Glimmer (Delcher et al., 1999) und Critica (Badger und Olsen, 1999) identifiziert. Die Ergebnisse beider Programme wurden verglichen und zu einem gemeinsamen Gen-Satz vereint. Wenn die beiden Programme unterschiedliche Start-Codons für Gene mit demselben Stop-Codon vorhersagten, wurde der längere Leserahmen verwendet. Gene mit einer Länge von weniger als 50 Nukleotiden wurden identifiziert, indem die zwischen den vorhergesagten Genabschnitten gelegenen DNA-Sequenzen mit Hilfe des Programms tblastn (Altschul et al., 1990) in die 6 möglichen Leserahmen übersetzt und mit den Proteinsequenzen verfügbarer archaeeller Genome verglichen wurden. Anhand der DNA-Sequenzen aller identifizierten Protein-codierenden Gene wurde mit Hilfe des im Staden Software Pakets (Staden et al., 2000) enthaltenen Programms „Spin“ die prozentuale Verwendung der einzelnen Codontriplets („Codon-Usage“) für *N. equitans* ermittelt. Anschließend wurde der komplette Gen-Satz mit dem Programm BioEdit (Hall, 1999) in Proteinsequenzen übersetzt, und diese mittels blastp (Altschul et al., 1990) mit der non-redundant protein database (ncbi.nlm.nih.gov) verglichen. Konservierte Protein-Domänen wurden zusätzlich durch Vergleiche mit den in den Domänen-Datenbanken Pfam (Bateman et al., 2002) und InterPro (Mulder et al., 2003) hinterlegten Proteinsequenzen identifiziert.

Zur Suche nach tRNA Genen in der Genomsequenz von *N. equitans* wurde das Programm tRNAscan-SE (Lowe und Eddy, 1997) verwendet. Gene ribosomaler RNAs wurden identifiziert, indem die Genomsequenz von *N. equitans* mittels blastn (Altschul et al., 1990) mit rRNA-Genen verschiedener Archaeen verglichen wurde.

8.2. Phylogenetische Analysen

Zum Alignment und zur Analyse von 16S rRNA Sequenzen wurde das ARB Software Paket (Ludwig und Strunk, 1997) verwendet. Phylogenetische Stammbäume wurden mittels der vom ARB-Programm zur Verfügung gestellten Distance-Matrix- (Neighbour-Joining und

Fitch-Margoliash Algorithmus, korrigiert nach Jukes und Cantor (1988), Maximum-Parsimony-, und Maximum-Likelihood- (fastDNAmI) Methoden erstellt. Zur Baumrekonstruktion wurden wahlweise ein Termini-Filter und ein für die archaeele Domäne spezifischer Consensus-Filter verwendet, der nur diejenigen Sequenzpositionen zum Vergleich zulässt, die in mehr als 50% der im Alignment enthaltenen Sequenzen identisch sind. Bootstrap-Analysen wurden mit Hilfe des im PHYLIP v.3.6a2.3 Pakets (Felsenstein, 2002) enthaltenen Programms Seqboot erstellt.

Alignments von Aminosäuresequenzen ribosomaler Proteine wurden mit dem Programm ClustalW (Thompson et al., 1994) berechnet, anschließend in BioEdit (Hall, 1999) von Hand optimiert und zu Konkatemeren zusammengefügt. Maximum-Likelihood Analysen wurden mit dem im PHYLIP v.3.6a2.3 Paket enthaltenen Programm Proml ausgeführt. Für Maximum-Parsimony Analysen wurde das Programm PAUP* (Swafford, 1996), und für Bayesian-Inference Analysen das Programm MRBAYES (Huelsenbeck und Ronquist, 2001) verwendet.

8.3. Rekonstruktion der Sekundärstruktur von 16S rRNA

Zur Rekonstruktion der Sekundärstruktur der 16S rRNA von *N. equitans* wurden zunächst mit Hilfe des im ARB Software Pakets enthaltenen Alignmenteditors die zueinander komplementären Sequenzabschnitte der einzelnen Helixbereiche identifiziert. Mit diesen Daten wurde in BioEdit eine RNA Strukturmaske angefertigt, anhand derer die Sekundärstruktur der 16S rRNA mit Hilfe des Programms RNAViz (De Rijk und De Wachter, 1997) graphisch dargestellt wurde.

III. Ergebnisse

A. Identifizierung von *Nanoarchaeum equitans*

1. Isolierung und Sequenzanalyse eines neuartigen 16S rRNA Gens aus der Co-Kultur KIN4/M

1.1. Restriktionskartierung

Je 1 µg chromosomale DNA von *Ignicoccus* sp. KIN4/I bzw. 2 µg chromosomale DNA der Co-Kultur KIN4/M wurden mit verschiedenen Restriktionsendonukleasen vollständig hydrolysiert, auf einem Agarosegel aufgetrennt und anschließend auf eine Nylonmembran geblottet. Dann wurde mit einer Sonde hybridisiert, die homolog zu einem Drittel der 16S rDNA von *Metallosphaera sedula* ist. Aufgrund der insgesamt hohen Konserviertheit aller 16S rRNA Gene ist diese Sonde spezifisch für archaelle 16S rDNA. In den Ansätzen mit *Ignicoccus* sp. KIN4/I DNA wurde jeweils eine Bande detektiert. In den Hydrolysaten der KIN4/M DNA waren stets zwei Banden zu erkennen, von denen eine identisch mit der Bande des entsprechenden KIN4/I Kontrollansatzes ist (Abb. 1A).

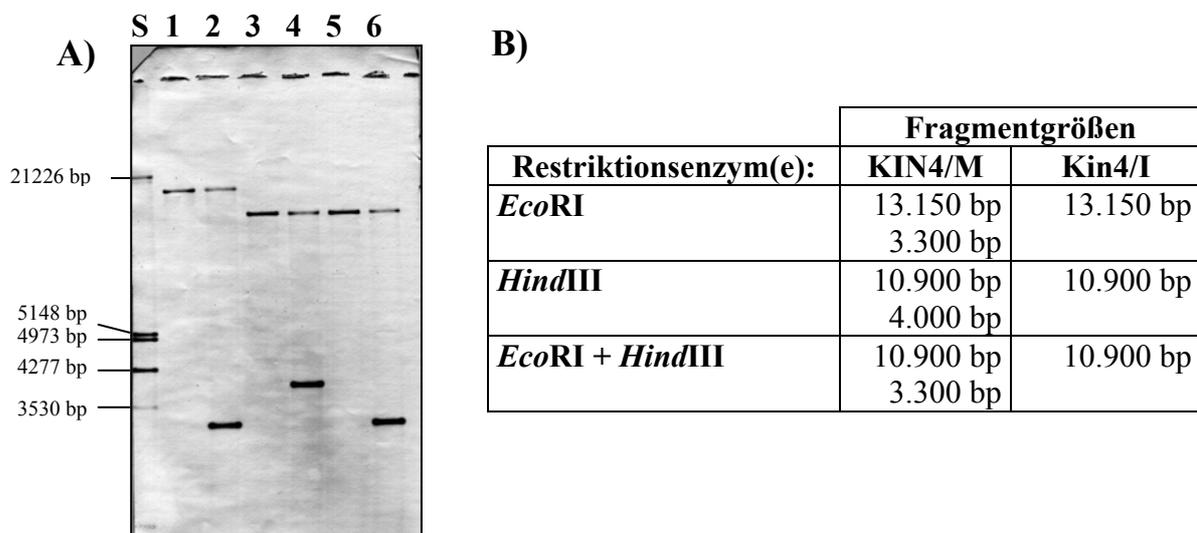


Abb. 1 Kartierung der Restriktionsschnittstellen in der Umgebung der 16S rRNA Gene in genomischer DNA aus der Co-Kultur KIN4/M und der *Ignicoccus* sp. KIN4/I Reinkultur. A) Southern Blot nach Hybridisierung mit einer 16S rDNA spezifischen Sonde. Spuren 1, 3, 5, DNA von *Ignicoccus* sp. KIN4/I. Spuren 2, 4, 6, DNA der Co-Kultur KIN4/M. Die DNA wurde mit folgenden Restriktionsendonukleasen geschnitten: Spuren 1 und 2: *EcoRI*; Spuren 3 und 4: *HindIII*; Spuren 5 und 6: *EcoRI* und *HindIII*; S: Längenstandard (DNA Molecular Weight Marker III; Roche); B) Geschätzte Größe der Restriktionsfragmente aus A).

Anhand des DIG-markierten Längenstandards wurden die in Abb. 1B angegebenen Größen der DNA-Fragmente abgeschätzt. Die gewonnenen Daten zeigen, dass sich nächstliegend stromauf- bzw. stromabwärts des gesuchten 16S rRNA Gens aus der Co-Kultur KIN4/M zwei *EcoRI* Schnittstellen befinden.

1.2. Klonierung des zusätzlichen 16S rRNA Gens aus der Co-Kultur KIN4/M

300 µg chromosomale DNA der Kultur KIN4/M wurde mit *EcoRI* und *HindIII* vollständig hydrolysiert und in einem Agarosegel aufgetrennt. Nach Anfärbung des Gels im Ethidiumbromidbad wurde der Bereich des Gels bestimmt, der die 3.300 bp großen Restriktionsfragmente enthielt. Dieser wurde mit einem sterilen Skalpell ausgeschnitten. Aus dem Gelblockchen konnten ca. 300 ng DNA extrahiert werden, die zum Anlegen einer Klonbank in einem mit *EcoRI* linearisierten Plasmid pUC18 verwendet wurde. Nach Transformation der erzeugten Plasmide in *E. coli* wurde von 45 Klonen die Plasmid-DNA isoliert, auf eine Nylonmembran geblottet und mit der 16S rDNA spezifischen Sonde hybridisiert. Die Plasmid-DNA eines Klons (pMH2) reagierte positiv und wurde weiter untersucht.

1.3. Sequenzanalyse des Plasmids pMH2

Die 3.349 bp lange Insertionssequenz des Plasmids pMH2 wurde mittels „primer-walking“ doppelsträngig sequenziert. Sie enthielt ein vollständiges 16S rRNA Gen. Zusätzlich wurde noch ein 357 bp langer, offener Leserahmen identifiziert, der für das Protein L18E einer 50S ribosomalen Untereinheit codiert.

2. Ganzzellhybridisierungen der Co-Kultur KIN4/M

2.1. Konstruktion von Hybridisierungssonden

Um die neuartige 16S rRNA Gensequenz aus der Kultur KIN4/M durch Ganzzellhybridisierung einem Organismus zuordnen zu können, wurden mit Hilfe des ARB-

Programms die Oligonukleotidsonden 511mcR, 515mcR und 934mcR entworfen, die komplementär zu Sequenzabschnitten der zugehörigen 16S rRNA sind. Die Sonden 511mcR und 934mcR besitzen zu allen in der ARB-Datenbank Regensburg hinterlegten Sequenzen (Stand: August 2003) mindestens einen Basenaustausch und die Sonde 515mcR besitzt mindestens drei Basenaustausche. In Tab. 3 sind die Sequenzen der Oligonukleotidsonden, deren Zielbereich in der neuartigen 16S rRNA, und zum Vergleich der entsprechende Sequenzbereich bei *Ignicoccus* sp. KIN4/I dargestellt.

Oligonukleotid 511mcR	3' -TTC GCC ACC CGT TC-5'
Zielsequenz	5' -AAG CGG UGG GCA AG-3'
<i>Ignicoccus</i> sp. KIN4/I	5' -AAG CGG <u>GGG</u> GCA AG -3'
Oligonukleotid 515mcR	3' -TCG CCA CCC GTT CTC CCC-5'
Zielsequenz	5' -AGC GGU GGG CAA GAG GGG-3'
<i>Ignicoccus</i> sp. KIN4/I	5' -AGC <u>GGG</u> <u>GGG</u> CAA <u>GUC</u> <u>UGG</u> -3'
Oligonukleotid 934mcR	3' -TCC TTA TCC GCC CCC TCG TG-5'
Zielsequenz	5' -AGG AAU AGG CGG GGG AGC AC-3'
<i>Ignicoccus</i> sp. KIN4/I	5' -AGG AAU <u>UGG</u> CGG GGG AGC AC-3'

Tab. 3: Sequenzvergleiche der Oligonukleotidsonden 511mcR, 515mcR und 934mcR mit den komplementären Abschnitten der 16S rRNA aus pMH2 und von *Ignicoccus* sp. KIN4/I. Fehlpaarungen mit der Sequenz von *Ignicoccus* sind unterstrichen.

2.2. Ganzzellhybridisierung mit *N. equitans*-spezifischen Sonden

Fixierte Zellen der Kultur KIN4/M wurden mit den Cy3-markierten Oligonukleotidsonden 511mcR, 515mcR und 934mcR hybridisiert. Die Hybridisierungen wurden bei 46°C mit 20% Formamid und 0,05% SDS im Hybridisierungspuffer durchgeführt. Mit jeder dieser drei Sonden zeigte sich ein positives Fluoreszenzsignal bei den kleinen Kokken, die den größeren *Ignicoccus*-Zellen anhaften. Die *Ignicoccus*-Zellen selbst zeigten kein Hybridisierungssignal mit den verwendeten Sonden. In Kontrollhybridisierungen wurden die für Euryarchaeota spezifische Sonde 511eaR (Burggraf, 1994), die Crenarchaeota-spezifische Sonde 515caR (Burggraf, 1994) sowie die für Archaea als universell geltende Sonde 934aR (Stahl und

Amann, 1991) verwendet. Mit keiner dieser Sonden wurde ein positives Hybridisierungssignal bei den kleinen Kokken beobachtet. Die *Ignicoccus*-Zellen zeigten dagegen positive Fluoreszenzsignale mit den Sonden 515caR und 934aR. Bei Doppelmarkierungen mit der Cy3-markierten Sonde 515mcR und der Rhodamin Green-markierten Sonde 515caR zeigten alle kleinen Kokken ein rotes Fluoreszenzsignal, während alle *Ignicoccus*-Zellen grün markiert waren (Abb. 2). Die fotografische Dokumentation dieses Hybridisierungsexperiments erfolgte an einem confokalen Laserscanning Mikroskop (Leica TCS SP2) am MPI für medizinische Forschung, Heidelberg, unter Anleitung von Verena C. Wimmer.

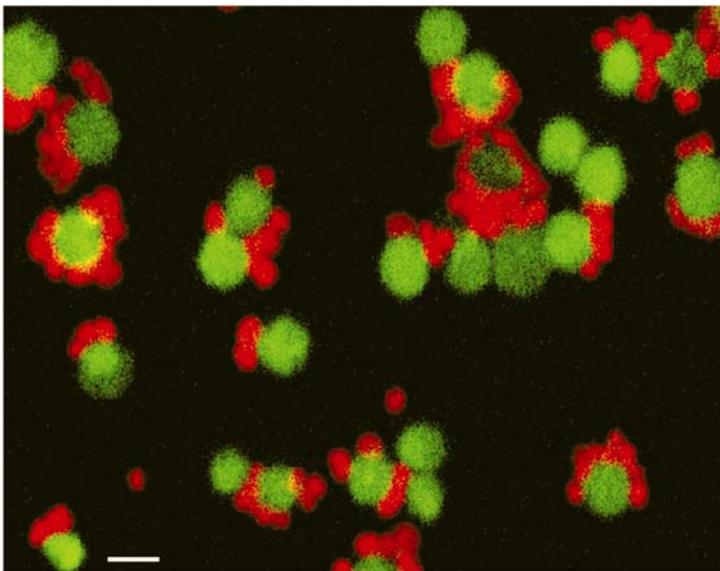


Abb. 2: Fluoreszenzaufnahme der Co-Kultur KIN4/M nach Doppelhybridisierung mit der Cy3-gekoppelten Sonde 515mcR und der Rhodamin Green-gekoppelten Sonde 515caR. Maßstab: 1 µm.

Aufgrund ihrer morphologischen Eigenschaften wird für die kleinen Kokken der Name „*Nanoarchaeum equitans*“ vorgeschlagen (*Nanos*: der Zwerg; *equitans*: reitend, aufsitzend)

3. Phylogenetische Einordnung von *N. equitans*

Die 16S rDNA Sequenz von *N. equitans* wurde in das aus mehr als 10.000 16S rDNA Sequenzen bestehende Alignment der ARB-Datenbank Regensburg eingefügt. Anschließend wurde sie mit den 16S rDNA Sequenzen von 135 Vertretern der Euryarchaeota, Crenarchaeota, Korarchaeota und Bacteria in Distance-Matrix Analysen, korrigiert nach Jukes und Cantor (1988), verglichen (zusammengefasst in Tab. 4). Es zeigte sich, dass der phylogenetische Abstand zwischen *N. equitans* und Vertretern der Euryarchaeota, Crenarchaeota und Korarchaeota mindestens 20% beträgt und damit im selben Größenbereich liegt wie der phylogenetische Abstand dieser archaeellen Reiche zueinander (vgl. Tab. 4). Damit ist *N. equitans* einem neuen archaeellen Reich zuzuordnen, für das der Name „Nanoarchaeota“ vorgeschlagen wird.

	<i>N. equitans</i>	Crenarchaeota	Euryarchaeota	Korarchaeota	Bacteria
<i>N. equitans</i>	-	80 – 71	80 – 67	75 – 72	70 – 60
Crenarchaeota	80 – 71	-	84 – 69	82 – 75	73 – 62
Euryarchaeota	80 – 67	84 – 69	-	80 – 70	74 – 60
Korarchaeota	75 – 72	82 – 75	80 – 70	-	72 – 64
Bacteria	70 – 60	73 – 62	74 – 60	72 – 64	-

Tab. 4: Zusammenfassung der Distance-Matrix Analyse zur Bestimmung phylogenetischer Ähnlichkeiten zwischen den 16S rDNA Sequenzen von *N. equitans* und 135 ausgewählten Vertretern der drei archaeellen Reiche sowie der Bacteria. Zahlenwerte geben Sequenzähnlichkeiten, korrigiert nach der Jukes & Cantor Methode, in Prozent an.

Auf 16S rRNA Sequenzen basierende phylogenetische Stammbäume wurden mit Distance-Matrix- (Neighbour Joining Analyse, korrigiert nach Jukes & Cantor), Maximum-Parsimony- und Maximum-Likelihood-Methoden erstellt. *N. equitans* nimmt in allen errechneten Stammbäumen eine isolierte, tief abzweigende Position innerhalb der archaeellen Domäne ein. Der Verzweigungspunkt variiert jedoch stark in Abhängigkeit von der Berechnungsmethode und den verwendeten domänenspezifischen Filtern. Er liegt entweder

an tiefster Position innerhalb der Euryarchaeota oder Crenarchaeota bzw. vor der Verzweigung dieser beiden Reiche. Dies kommt auch in insignifikant niedrigen Bootstrap-Werten von weniger als 60% in allen Berechnungen zum Ausdruck. In Abb. 3 ist exemplarisch ein nach der Maximum-Likelihood-Methode erstellter Stammbaum dargestellt.

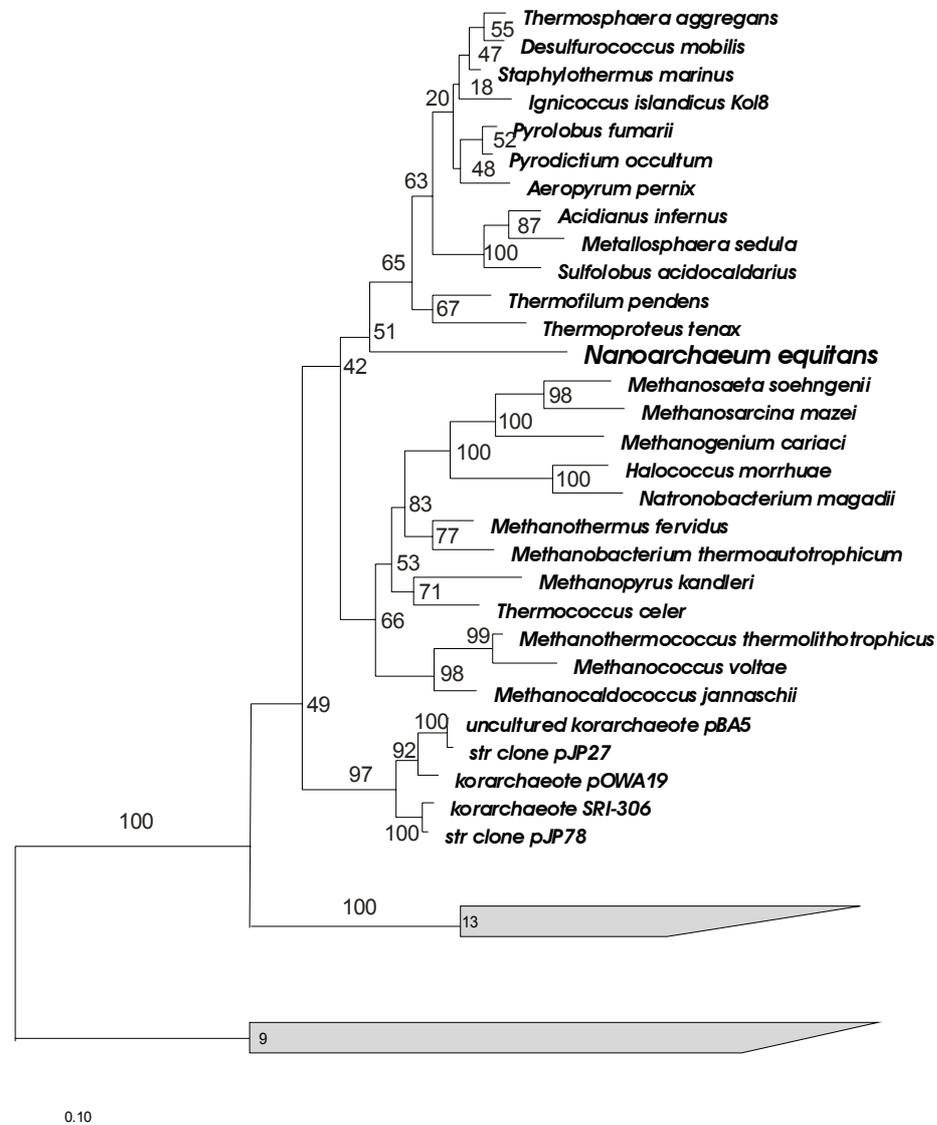


Abb. 3: Phylogenetische Position von *N. equitans* im 16S rRNA Stammbaum der Archaea. Der Baum basiert auf einer Maximum-Likelihood Analyse; die Zahlen geben Bootstrap-Werte in Prozent an. Maßstab: 10 Austausche pro 100 Nukleotide.

Die 16S rDNA Sequenz von *N. equitans* weist Basenaustausche in nahezu allen konservierten Bereichen auf, die bisher als domänenspezifisch oder universell erachtet wurden. Tab. 7 (s. S. 60) vergleicht die Sequenz der routinemäßig verwendeten universellen und domänenspezifischen Primer mit den homologen Bereichen der 16S rDNA von *N. equitans*.

4. Darstellung der Sekundärstruktur der 16S rRNA

Die Sekundärstruktur der 16S rRNA von *N. equitans* (Abb. 4) entspricht dem Standardmodell, das für prokaryotische 16S rRNAs vorgeschlagen wurde (Gutell et al., 1985; Woese, 1987). Keine ungewöhnlichen Basenpaarungen oder strukturellen Abweichungen konnten in den phylogenetisch konservierten Bereichen gefunden werden. Die Struktur der Helices 17, 18, 36 und 47 ist charakteristisch für Archaea und unterscheidet sich hier deutlich von den für Bacteria typischen Faltungen. Zusätzliche, für eukaryotische 18S rRNAs charakteristische Strukturen konnten bei *N. equitans* erwartungsgemäß nicht gefunden werden.

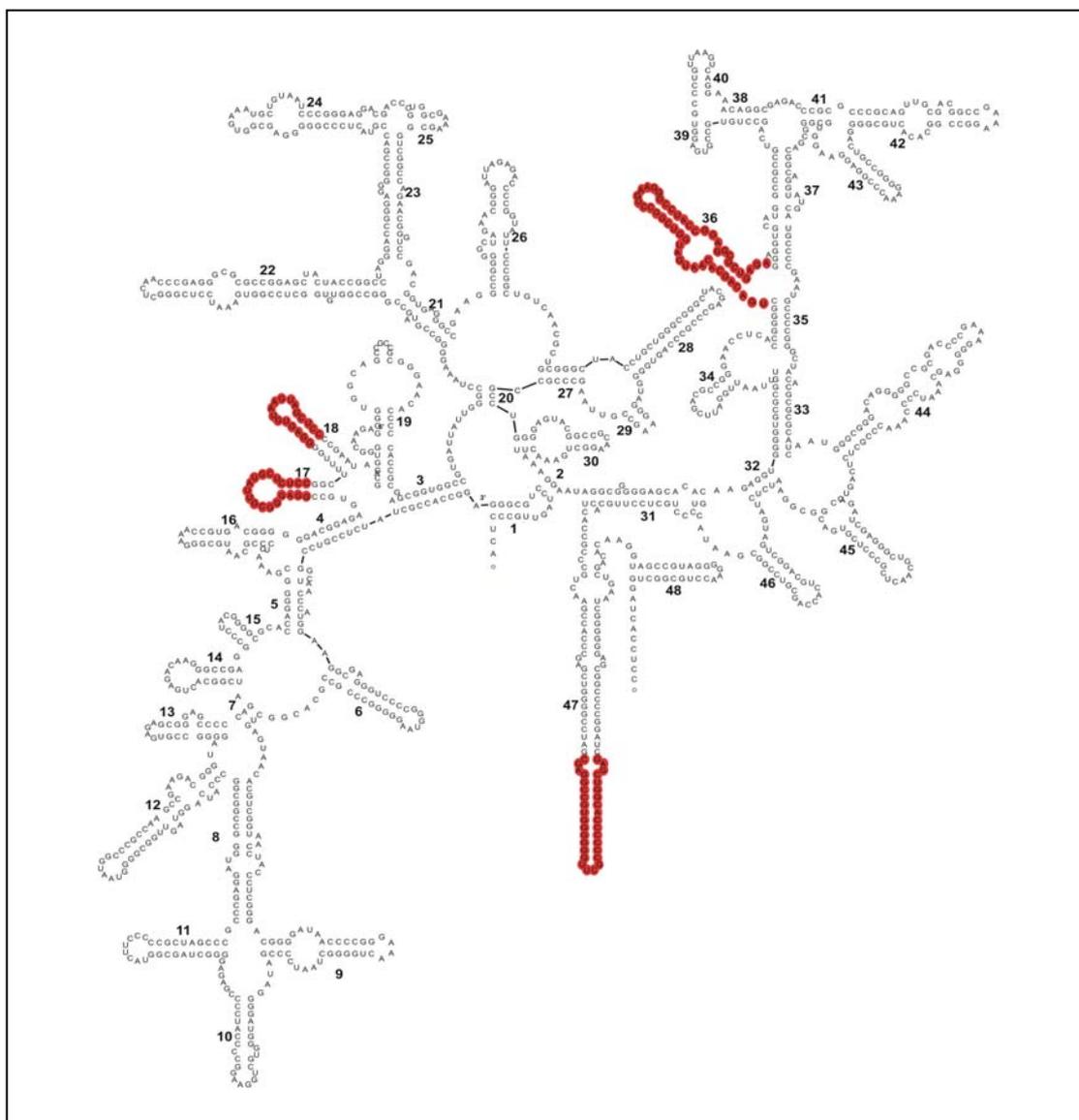


Abb. 4: Sekundärstruktur der 16S rRNA von *N. equitans*. Rot hervorgehobene Bereiche kennzeichnen für Archaea typische Sekundärstrukturen. Zahlen geben die Helixnummern an.

5. Anzucht der Co-Kultur KIN4/M in Großkulturen

Da für molekularbiologische und biochemische Untersuchungen an *N. equitans* größere Zellmengen nötig waren, wurde die Co-Kultur KIN4/M in Fermentern im 50 l- und 300 l-Maßstab gezüchtet. Zur Optimierung der Wachstumsbedingungen von *N. equitans* wurden dazu unterschiedliche Kultivierungsbedingungen getestet.

5.1. Wachstum unter autotrophen Bedingungen und einem Gasfluss von 1 l/min

Ein 50 l-Fermenter wurde mit 500 ml KIN4/M-Vorkultur angeimpft, sodass die anfängliche Zellkonzentration von *Ignicoccus* bei ca. $1,75 \times 10^5$ Zellen/ml lag. Etwa die Hälfte der *Ignicoccen* war mit einer, zwei oder drei *N. equitans*-Zellen besetzt; Das Verhältnis von *Ignicoccus*- zu *N. equitans*-Zellen betrug etwa 1:2. Nach zweistündiger Inkubation wurde der Fermenter mit H_2/CO_2 (80:20; v/v) und einem Gasfluss von ca. 1 l/min durchgast. Nach ca. zehn Stunden Inkubation erreichten die *Ignicoccen* bei einer Zellkonzentration von etwa 5×10^6 Zellen/ml die stationäre Phase. Nur etwa 30-50% der *Ignicoccen* waren mit einer oder zwei, seltener mit bis zu vier *N. equitans*-Zellen besetzt. Das Verhältnis von *Ignicoccus*- zu *N. equitans*-Zellen lag dabei zwischen 2:1 und 1:1 (Abb. 5). Wenige Stunden nach dem Beimpfen des Fermenters und bis zum Ende der Zellzucht war im Medium H_2S in großer Menge nachweisbar.

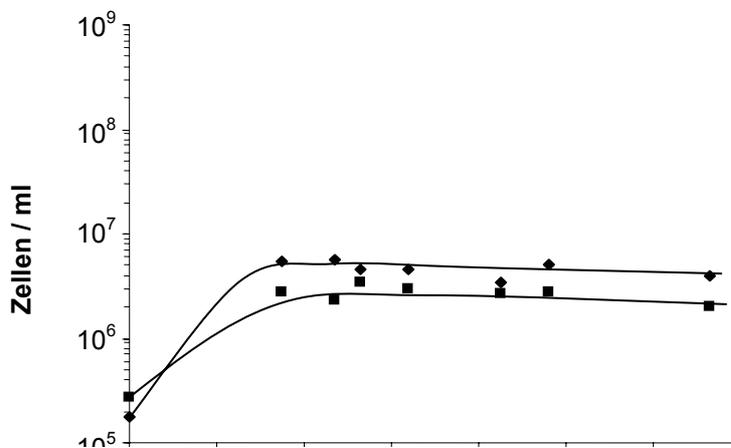


Abb. 5: Wachstum von *Ignicoccus* sp. KIN4/I (◆) und *N. equitans* (■) im 50 l-Fermenter unter autotrophen Wachstumsbedingungen und bei einer Durchgasungsrate von 1 l/min.

5.2. Wachstum unter autotrophen Bedingungen und einem Gasfluss von 20 l/min

Ein 50 l-Fermenter wurde mit 500 ml KIN4/M-Vorkultur angeimpft, wie unter III.5.1 beschrieben. Zwei Stunden nach dem Animpfen wurde der Fermenter mit H_2/CO_2 (80:20; v/v) bei einem Gasfluss von ca. 1 l/min durchgast. Nach ca. 15 Stunden Inkubation lag die Zellkonzentration der *Ignicoccus* bei 1×10^6 Zellen/ml. Zu diesem Zeitpunkt waren etwa 40% der *Ignicoccus* mit einer bis drei *N. equitans*-Zellen besetzt und das Verhältnis von *Ignicoccus*- zu *N. equitans*-Zellen lag bei etwa 1:1. Der Gasfluss wurde ab diesem Zeitpunkt auf ca. 20 l/min H_2/CO_2 (80:20; v/v) erhöht, und dadurch das im Medium gelöste H_2S nahezu vollständig ausgetrieben. Sieben Stunden später wurden $1,7 \times 10^6$ *Ignicoccus*-Zellen pro ml ausgezählt, während sich die Zahl der *N. equitans*-Zellen vervierfacht hatte. 50% der *Ignicoccus* waren mit *N. equitans* besetzt und an ca. 25% der besetzten *Ignicoccus* hafteten bis zu zehn *N. equitans*-Zellen. Zusätzlich wurden ca. 7×10^5 *N. equitans*-Zellen pro ml ausgezählt, die nicht an *Ignicoccus*-Zellen gebunden waren. In der stationären Phase wurde für *Ignicoccus* eine Zellkonzentration von 2×10^7 Zellen/ml bestimmt, während die Konzentration der *N. equitans*-Zellen bei etwa 4×10^8 Zellen/ml lag. Alle *Ignicoccus*-Zellen waren mit sieben oder mehr *N. equitans*-Zellen besetzt. Die Konzentration der nicht anhaftenden *N. equitans*-Zellen im Medium betrug ca. 2×10^8 Zellen/ml (Abb. 6). Vergleichbar hohe Zahlen von nicht anhaftenden *N. equitans*-Zellen konnten ebenfalls beobachtet werden, wenn der Fermenter mit 20 l/min $N_2/H_2/CO_2$ (65:15:20; v/v/v) durchgast wurde.

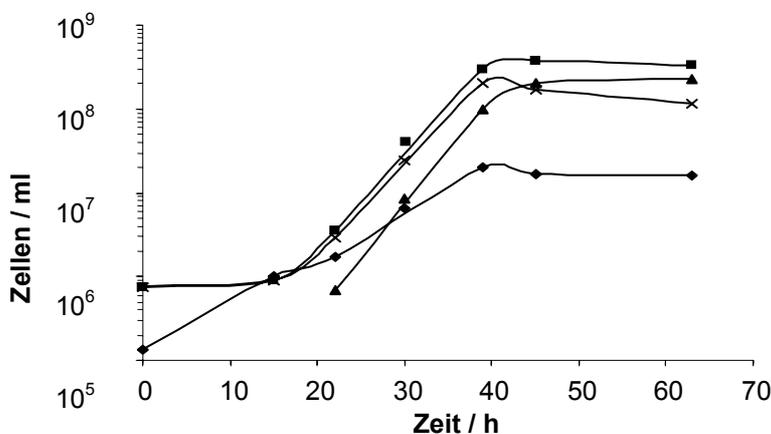


Abb. 6: Wachstum von *Ignicoccus* sp. KIN4/I (◆) und *N. equitans* (■) im 50 l-Fermenter unter autotrophen Bedingungen und bei einer Durchgasungsrate von 20 l/min. Die Gesamtzahl der *N. equitans*-Zellen (■) ist unterteilt in an *Ignicoccus*-Zellen haftende (×) und freie (▲) Zellen.

6. Abschätzung der Genomgröße von *N. equitans* durch Puls-Feld-Gelelektrophorese (PFGE)

Zur Bestimmung der ungefähren Genomgröße von *N. equitans* wurden Zellen der Co-Kultur KIN4/M wie unter II.4.3 beschrieben aufgereinigt, so dass das abgeschätzte Verhältnis von *N. equitans* zu *Ignicoccus*-Zellen bei etwa 10.000 zu 1 lag.

Jeweils ca. 2×10^8 dieser aufgereinigten *N. equitans*-Zellen wurden in Agaroseblöckchen eingebettet und anschließend lysiert. Die in den Blöckchen enthaltene DNA wurde mit den Restriktionsendonukleasen *AscI*, *BssHIII*, *NotI*, *PacI* oder *SacII* hydrolysiert, und die Spaltprodukte durch PFGE aufgetrennt. Die Hydrolyse mit *AscI*, *BssHIII* oder *NotI* führte zu zwei bis vier Restriktionsfragmenten, die im Pulsfeldgel gut voneinander zu unterscheiden waren (Abb. 7, Spur 1-3). Die abgeschätzten Fragmentgrößen sind in Tab. 5 zusammengefasst. Bei der Hydrolyse mit *PacI* oder *SacII* entstanden jeweils mehr als 10 Spaltprodukte, so dass eine Auswertung dieser Gelspuren nicht möglich war (nicht gezeigt).

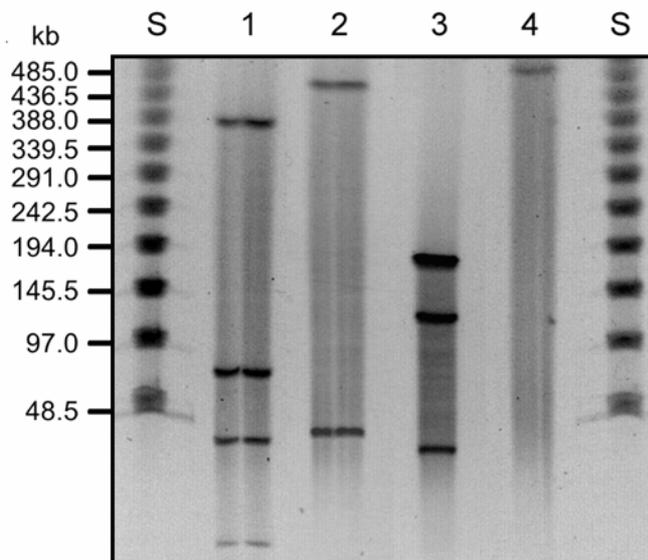


Abb. 7: Auftrennung von verdauter und unverdauter chromosomaler DNA von *N. equitans* durch Puls-Feld-Gelelektrophorese. Die DNA wurde mit folgenden Restriktionsendonukleasen geschnitten: Spur 1: *BssHIII*; Spur 2: *AscI*; Spur 3: *NotI*; Spur 4: ungeschnittene DNA; S = Lambda Ladder PFG Marker (New England Biolabs).

Durch Aufsummierung der Fragmentlängen in den einzelnen Ansätzen kann für *N. equitans* eine Genomgröße von ca. 490 kb abgeschätzt werden. Bei Auftrennung der DNA im Pulsfeldgel ohne vorherige Restriktionshydrolyse ist eine einzelne, schwache Bande mit etwa

490 kb zu erkennen (Abb. 7, Spur 4), bei der es sich wahrscheinlich um die genomische DNA von *N. equitans* handelt.

Verwendete Restriktionsendonuklease:	Fragmentgrößen (kb):	Geschätzte Genomgröße (kb):
<i>Bss</i> HII	370 + 70 + 30 + 10	480
<i>Asc</i> I	455 + 35	490
<i>Not</i> I	175 + 170 + 120 + 25	490
Ungeschnittene DNA	490	490

Tab. 5: Geschätzte Längen der Restriktionsfragmente, und daraus resultierende Genomgröße von *N. equitans*.

B. Verbreitung der Nanoarchaeota

1. Nachweis von Nanoarchaeota in Umweltproben durch PCR mit Nanoarchaeota-spezifischen Primern

Aus jeder der in Tab. 2 (s.S. 18) aufgeführten Umweltproben konnten 50 bis 100 ng DNA gewonnen werden, die zur weiteren Aufreinigung auf einem Low-Meltingpoint-Agarosegel aufgetrennt wurde. Anschließend wurde die DNA-Bande aus dem Gel ausgeschnitten, das Agaroseblöckchen aufgeschmolzen und Aliquots des DNA-Agarosegemisches direkt in PCR-Ansätzen als Matrize verwendet.

Um zu überprüfen, ob die gereinigte DNA zur PCR-Amplifikation geeignet ist, wurde sie in eine PCR mit der Archaea-spezifischen Primerkombination 8aF – 1512uR eingesetzt. Bei allen getesteten Ansätzen konnte hierbei ein positives PCR-Signal erhalten werden. Parallel dazu wurde mit den DNA-Proben eine PCR mit den *N. equitans*-spezifischen Primerkombinationen 7mcF – 1511mcR, 7mcF – 520mcR, 7mcF – 1116mcR, 518mcF – 1116mcR, bzw. 518mcF – 1511mcR durchgeführt. Bei folgenden DNA-Proben und mit den angegebenen Primerkombinationen wurden hierbei positive PCR-Signale erhalten:

DNA-Probe:	Primerkombination:
OP9	7mcF-1511mcR
CU1	7mcF-1511mcR
LPC33	7mcF-1511mcR, 7mcF – 520mcR, 7mcF – 1116mcR, 518mcF – 1116mcR, 518mcF – 1511mcR

Die mit der Primerkombination 7mcF-1511mcR erhaltenen PCR-Produkte wurden in einen Vektor inseriert, in *E. coli* transformiert und vermehrt. Von jeweils 30 zufällig ausgewählten Klonen wurde die Plasmid-DNA präpariert und zur Identifizierung von unterschiedlichen Insertionssequenzen Restriktionshydrolysen mit den Enzymen *Sau3AI* und *RsaI* durchgeführt. Die Auftrennung der Restriktionsfragmente im Agarosegel zeigte, dass in den Proben OP9, CU1 und LPC33 jeweils nur ein Sequenztyp enthalten war (nicht gezeigt). Die Insertionssequenz jeweils eines Klones aus jeder Probe wurde vollständig sequenziert.

Die Sequenz aus der Probe LPC33 war zu 100% identisch mit der 16S rDNA Sequenz von *N. equitans*. Bei den Sequenzen aus den Proben OP9 und CU1 handelte es sich um bis dahin unbekannte archaeelle 16S rDNA Sequenzen, die eine phylogenetische Distanz von 8,0 zueinander aufweisen. Der phylogenetische Abstand zur *N. equitans* 16S rDNA Sequenz

beträgt 20,2 für die OP9-Sequenz und 19,6 für die CU1-Sequenz. Trotz dieser großen Sequenzunterschiede sind die zwei Sequenzen zu der 16S rDNA-Sequenz von *N. equitans* näher verwandt als zu denen von anderen archaeellen Reichen oder von den Bacteria (Tab. 6).

Zur Rekonstruktion von auf 16S rRNA basierenden phylogenetischen Stammbäumen wurden Distance-Matrix- (Neighbour-Joining und Fitch-Margoliash Algorithmus, korrigiert nach Jukes & Cantor), Maximum-Parsimony- und Maximum-Likelihood-Methoden verwendet. Zusätzlich wurden für jede Baumberechnung Bootstrap Analysen (jeweils 100 Resamplings) durchgeführt, um die Signifikanz der erhaltenen Verzweigungspunkte abschätzen zu können. In allen phylogenetischen Analysen gruppieren die OP9- und CU1-Sequenz zusammen mit der von *N. equitans* (gestützt durch Bootstrap-Werte von 98-100%), was die Zugehörigkeit dieser Sequenzen zum Reich Nanoarchaeota belegt. Der neu berechnete Abzweigungspunkt des Nanoarchaeota-Astes lag bei allen Baumrekonstruktionen nahe der Wurzel der archaeellen Domäne. Er variierte jedoch wieder stark in Abhängigkeit von der verwendeten Berechnungsmethode und von den gesetzten domänenspezifischen Filtern und lag entweder an tiefster Position auf dem crenarchaeellen oder euryarchaeellen Ast bzw. vor dem Verzweigungspunkt dieser beiden Reiche. Auch konnten bei keiner Berechnungsmethode signifikante Bootstrap-Werte für die Position des Verzweigungspunktes erhalten werden. In Abb. 8 und Abb. 9 sind exemplarisch ein nach der Neighbour-Joining-Methode und ein nach der Maximum-Likelihood-Methode rekonstruierter phylogenetischer Baum dargestellt.

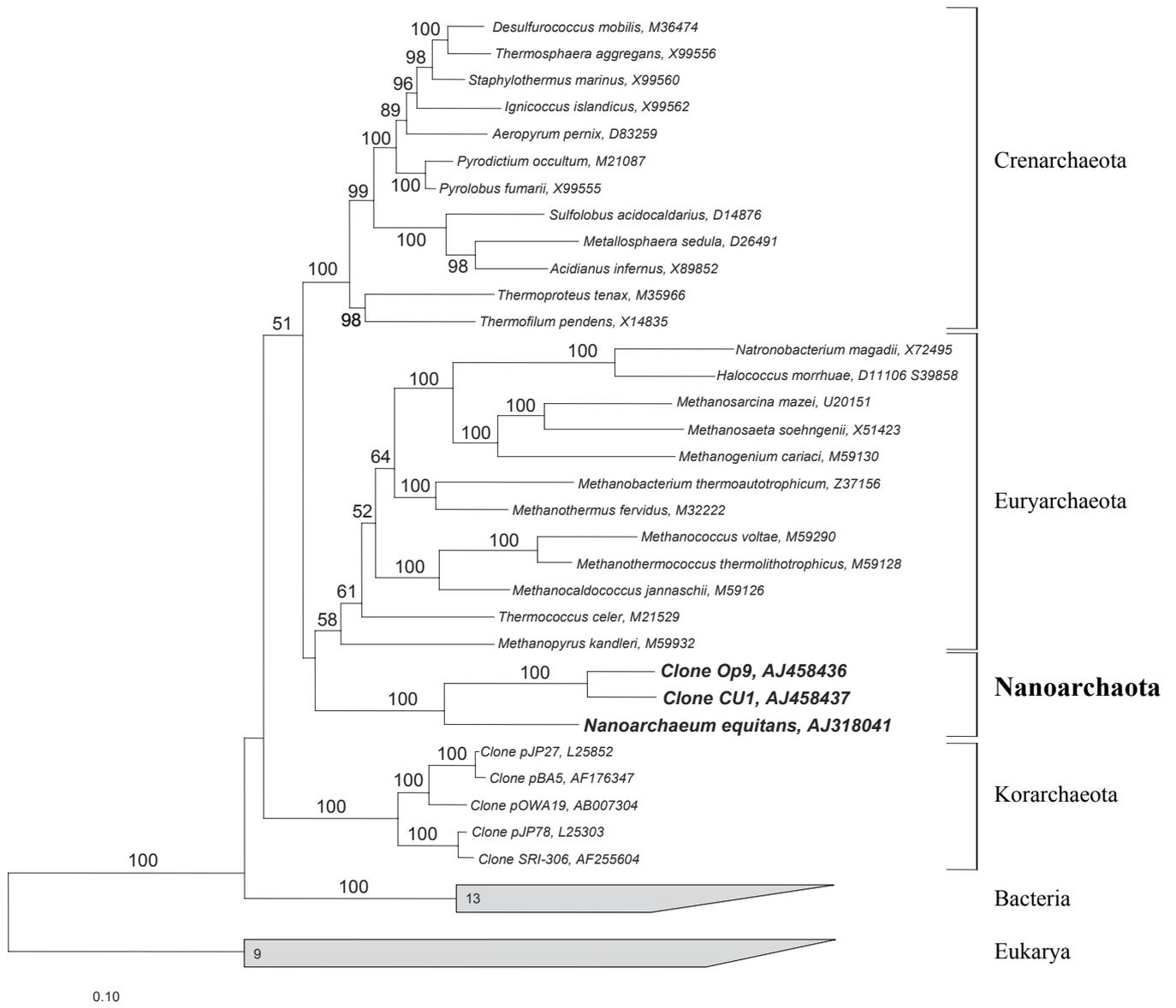


Abb. 8: Phylogenetischer Stammbaum der archaeellen Domäne inklusive der Nanoarchaeota, basierend auf 16S rRNA Sequenzvergleichen. Der Baum wurde nach der Neighbour-Joining-Methode erstellt. Die Accession-Nummern der Sequenzen sind angezeigt. Die Zahlen geben Bootstrap-Werte in Prozent an.

Maßstab: 10 Austausche pro 100 Nukleotide.

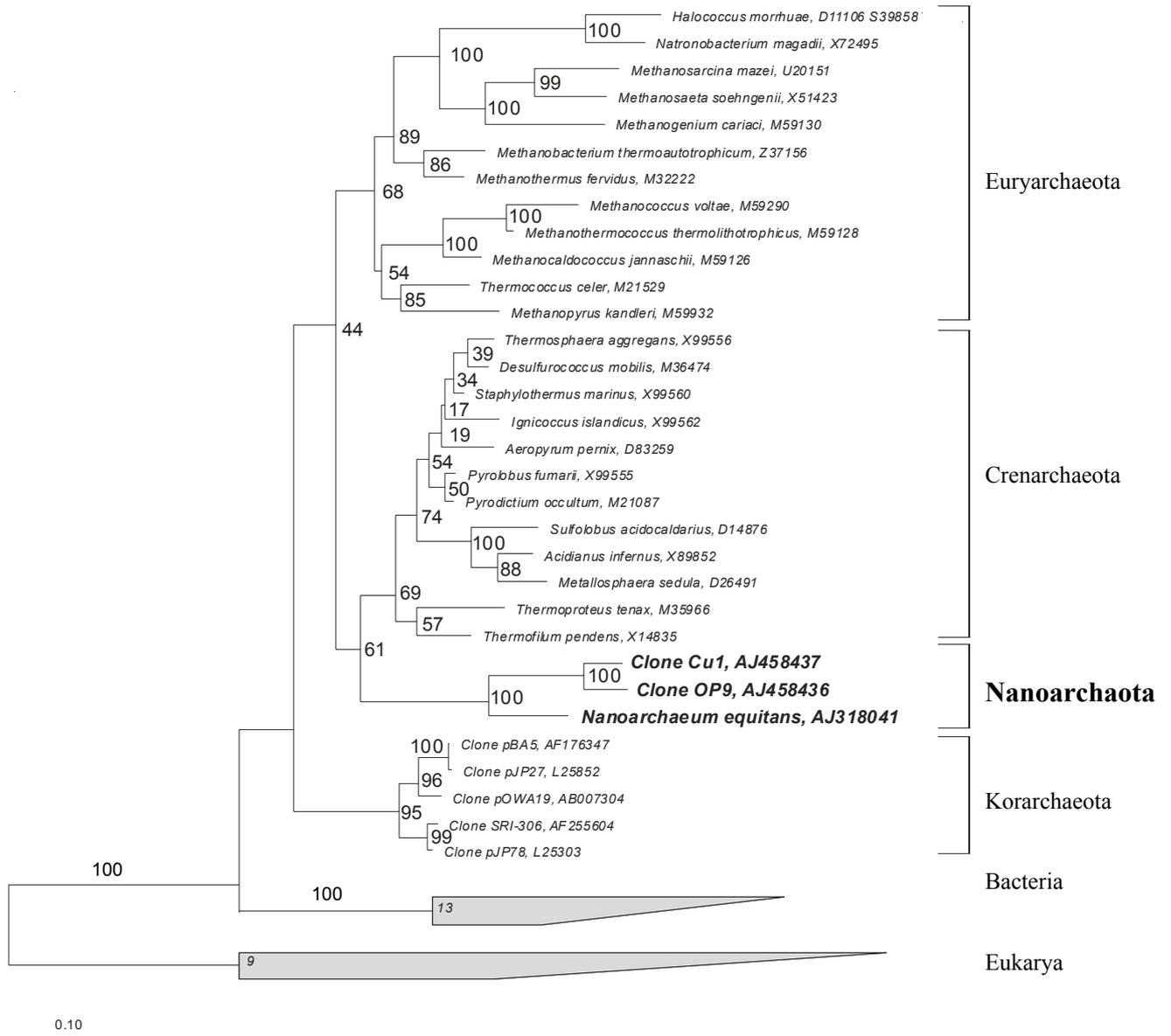


Abb. 9: Phylogenetischer Stammbaum der archaellen Domäne inklusive der Nanoarchaeota, basierend auf 16S rRNA Sequenzvergleichen. Der Baum wurde nach der Maximum-Likelihood-Methode erstellt. Die Accession-Nummern der Sequenzen sind angezeigt. Die Zahlen geben Bootstrap-Werte in Prozent an.

Maßstab: 10 Austausche pro 100 Nukleotide.

Wie auch bei *N. equitans* weisen die 16S rDNA Sequenzen der Klone OP9 und CU1 Basenaustausche in nahezu allen als Archaea-spezifisch oder universell konserviert geltenden Regionen auf, die routinemäßig als Bindungsstellen für PCR-Primer genutzt werden. Die OP9- und CU1-Sequenzen weichen in diesen Bereichen jedoch auch von der Sequenz von *N. equitans* ab. In Tab. 7 werden die Sequenzen standardmäßig verwendeter PCR-Primer mit den homologen Regionen der 16S rDNAs aus *N. equitans* sowie aus den Klonen OP9 und CU1 verglichen.

Primer	8aF	109aF
Sequenz	TCY GGT TGA TCC TGC C	ACK GCT CAG TAA CAC GT
<i>Nanoarchaeum equitans</i>	TCC <u>CGT</u> TGA TCC TGC <u>G</u>	ACG GCT CAG TAA CAC GT
OP-9 / CU-1 –Sequenz	n.b.	ACG GCT CAG TAA CAC GT
Primer	334aF	344aF
Sequenz	YCS RGG SCC TAY GGG G	CGG GGY GCA SCA GGC GCG AA
<i>Nanoarchaeum equitans</i>	CCG AGG CCC TAC GGG G	CGG GGC GCA CCA GGG GCG AA
OP-9 / CU-1 –Sequenz	CCG AGG TCC TAC GGG A	CGG GAT GCA CCA GGG GCG AA
Primer	519uF	934aR
Sequenz	CAG CMG CCG CGG TAA TAC	GTG CYC CCC CGC CAA TTC CT
<i>Nanoarchaeum equitans</i>	CAG CMG CCG CGG GAA <u>CAC</u>	GTG CTC CCC CGC CTA TTC CT
OP-9 / CU-1 –Sequenz	CAG TCG CCA CGG GAA TAC	GTG CCC CCC CGC CTA TTC CT
Primer	1044aF	1119aR
Sequenz	GAG AGG WGG TGC ATG GCC G	GGY RSG GGT CTC GCT CGT T
<i>Nanoarchaeum equitans</i>	GAG AGG AGG TGC ATG GCC G	GGC GCG GGT CTC <u>GCC</u> <u>TGT</u> T
OP-9 / CU-1 –Sequenz	GAG AGG AGG TGC ATG GCT G	GGT GCG GGT CGC GCT CGT T
Primer	1406uR	1512uR
Sequenz	ACG GGC GGT GTG TRC AA	ACG GHT ACC TTG TTA CGA CTT
<i>Nanoarchaeum equitans</i>	ACG GGC GGT GAG TGC AA	ACG GCT ACC TTG <u>TGT</u> CGA CTT
OP-9 / CU-1 –Sequenz	ACG GGC GGT GAG AGC AA	n.b.

Tab. 7: Vergleich von Standard PCR-Primern mit homologen Sequenzabschnitten der Nanoarchaeota-16S rRNA Sequenzen. Basenaustausche in *N. equitans* sind unterstrichen; Austausch in CU1 und OP9 sind fett gedruckt. Nanoarchaeota-spezifische Basenaustausche sind grau hinterlegt. n.b. = nicht bestimmt.

2. Anreicherung von Vertretern der Nanoarchaeota aus Umweltproben

Um zu testen, ob aus den Originalproben OP9 und CU1 Vertreter der Nanoarchaeota kultiviert werden können, wurden Anreicherungsversuche unter den in Tab. 8 angegebenen Bedingungen durchgeführt. Als Grundmedium wurde dabei Allen-Medium mit pH 6,0 verwendet.

Gasphase:	Medienzusätze:	Temperatur:
H ₂ /CO ₂	S ⁰	85°C
H ₂ /CO ₂	S ⁰ ; 0,1% Hefeextrakt	85°C
H ₂ /CO ₂	0,1% NO ₃ ⁻ ; 0,1% Hefeextrakt	85°C
H ₂ /CO ₂	0,1% S ₂ O ₃ ²⁻ ; 0,1% Hefeextrakt	85°C
N ₂ /CO ₂	S ⁰ ; 0,1% Hefeextrakt	85°C
N ₂ /CO ₂	0,1% Hefeextrakt	85°C

Tab. 8: Anreicherungsbedingungen für die Originalproben OP9 und CU1.

Ansätze aus beiden Originalproben, in denen elementarer Schwefel und 0,1% Hefeextrakt sowie N₂/CO₂ als Gasphase enthalten war, waren nach 2 bis 3 Tagen Inkubation mit einer Mischpopulation aus größeren Kokken sowie *Thermofilum*- und *Thermoproteus*-ähnlichen Stäbchen bewachsen. 5-10% der dickeren Stäbchen waren dabei mit sehr kleinen Kokken besetzt, die einen Zelldurchmesser von etwa 0,3 – 0,4 µm aufwiesen. Bei Färbungen mit dem DNA-spezifischen Fluoreszenzfarbstoff DAPI zeigten die kleinen Kokken kräftige Fluoreszenz (in Abb. 10 gezeigt an einer Anreicherung aus CU1).

Anreicherungen aus den Originalproben OP9 und CU1 wurden jeweils einmal in frisches Medium überimpft, und aus diesen Ansätzen die Gesamt-DNA präpariert. Nach PCR-Amplifikationen mit den Nanoarchaeota-spezifischen Primern 7mcF und 1511mcR konnte in beiden Ansätzen ein PCR-Produkt der erwarteten Länge nachgewiesen werden.

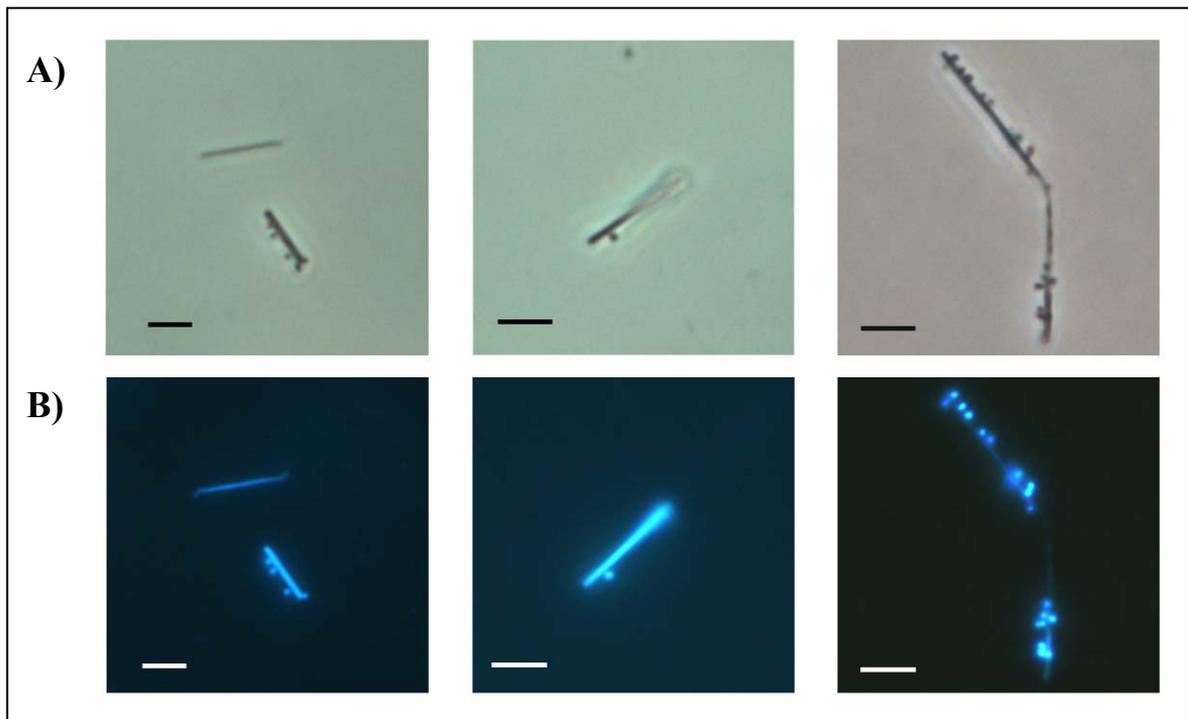


Abb. 10: Anreicherung aus der Originalprobe CU1. Reihe A: Phasenkontrastaufnahme; Reihe B: Fluoreszenzaufnahme des selben Ausschnitts nach Färbung mit DAPI. Maßstab: 1 μm .

Im Laufe der Überimpfungen der Kulturen unter gleich bleibenden Bedingungen nahm sowohl die Zahl der Stäbchen als auch die der kleinen Kokken zunehmend zu Gunsten größerer Kokken ab. Nach zwei bis vier Überimpfungen waren bei mikroskopischer Kontrolle keine Stäbchen mit anhaftenden kleinen Kokken mehr auffindbar.

Versuche mit Hilfe der optischen Pinzette durch Vereinzelung stäbchenförmiger Zellen mit anhaftenden kleinen Kokken eine Co-Kultur aus diesen beiden Zellmorphotypen zu erhalten, waren ohne Erfolg. Aus einem dieser Vereinzelungsversuche ging jedoch eine (als CU1/L1B bezeichnete) Reinkultur stäbchenförmiger Zellen hervor, die im Rahmen einer Diplomarbeit näher charakterisiert wurde (Jahn, 2003). Der Organismus wurde nach der Sequenzierung seines 16S rRNA Gens der Gattung *Thermoproteus* zugeordnet.

3. Identifizierung neuer Vertreter der Nanoarchaeota durch Ganzzellhybridisierungen

3.1. Konstruktion von Hybridisierungssonden

Um durch Ganzzellhybridisierung eine Zuordnung der in der Anreicherungskultur CU1 enthaltenen Organismen zu den Nanoarchaeota zu ermöglichen, wurden die drei Oligonukleotidsonden 359pbmcR, 515pbmcR und 934pbmcR konstruiert (Tab. 9). Die Sonden sind zu Sequenzabschnitten der 16S rRNA des CU1-Klons komplementär und weisen mindestens einen Basenaustausch zu allen in der ARB-Datenbank Regensburg hinterlegten 16S rDNA Sequenzen auf.

Oligonukleotid:	Sequenz:
359pbmcR	5'-CCC TGG TGC ATC CCG TAG GA-3'
515pbmcR	5'-CCC CTC TTG CCC ACC GCT-3'
934pbmcR	5'-GTG CCC CCC CGC CTA TTC CT-3'

Tab. 9: Sequenzen der Oligonukleotidsonden 360pbmcR, 515pbmcR und 934pbmcR, die für die in der Probe CU1 enthaltenen Vertreter der Nanoarchaeota spezifisch sind.

3.2. Hybridisierungsergebnis mit den CU1-Nanoarchaeota-spezifischen Sonden

Anreicherungen aus der Originalprobe CU1 wurden mit den Cy3-markierten Oligonukleotidsonden 359pbmcR, 515pbmcR und 934pbmcR hybridisiert. Optimale Ergebnisse wurden bei einer Hybridisierungstemperatur von 46°C und mit 20% Formamid und 0,05% SDS im Hybridisierungspuffer erhalten. Mit jeder der drei Sonden wurde ein positives Fluoreszenzsignal bei den kleinen, an den stäbchenförmigen Zellen anhaftenden Kokken beobachtet. Durch gleichzeitige Verwendung aller drei Sonden konnte die Intensität des Fluoreszenzsignals verstärkt werden (Abb. 11, Reihe B). Die kleinen Kokken waren dabei der einzige Morphotyp, der durch die Sonden detektiert wurde.

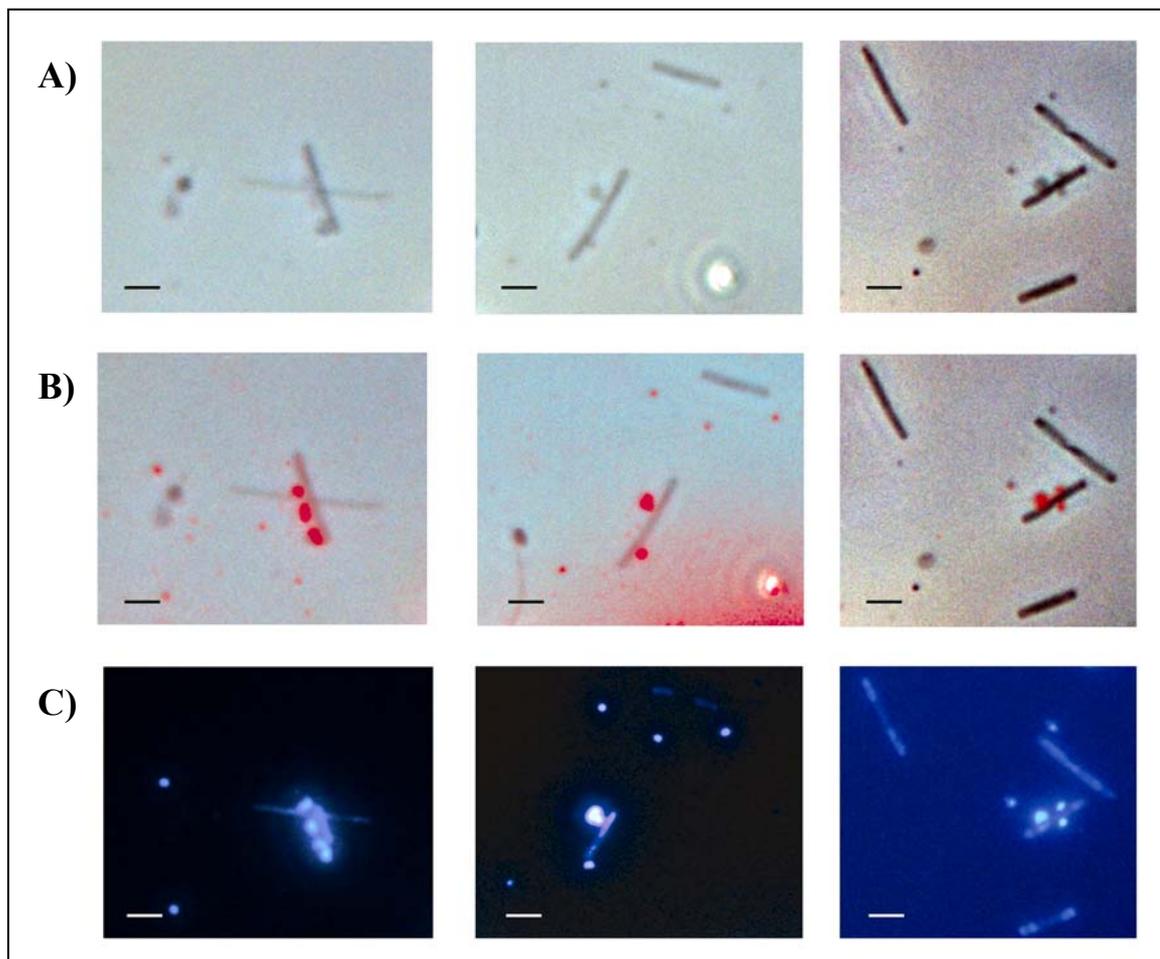


Abb. 11: Ganzzellhybridisierungen einer Anreicherung aus der Originalprobe CU1 mit Nanoarchaeota-spezifischen Oligonukleotidsonden. Reihe A: Phasenkontrastaufnahme; Reihe B: Fluoreszenzaufnahme des selben Ausschnitts. Die Zellen wurden mit den Cy3-markierten Sonden 359pbmcR, 515pbmcR und 934pbmcR hybridisiert; Reihe C: Fluoreszenzaufnahme desselben Ausschnitts nach Färbung mit DAPI. Maßstab: 1 μ m.

C. Analyse des Genoms von *N. equitans*

1. Genomsequenzierung und Genomrekonstruktion

Das Gesamtgenom von *N. equitans* wurde von der Firma Diversa Corp. (San Diego, USA) in Zusammenarbeit mit der Firma Celera Genomics (Rockville, USA) sequenziert. Dazu wurde aus *N. equitans*-Zellen, die wie unter II.A.4.3 beschrieben aufgereinigt wurden, die genomische DNA isoliert und enzymatisch mit Restriktionsendonukleasen oder durch physikalische Scherung fragmentiert. Von kürzeren Fragmenten (mit einer durchschnittlichen Länge von 2,8 kbp) wurde eine Klonbibliothek in einem high-copy number Vektor angelegt, und von längeren Fragmenten (mit durchschnittlich 6,3 kbp) eine Klonbibliothek in einem low-copy number Vektor. Die Vektor-Insertionssequenzen wurden durch „primer-walking“ von beiden Seiten vollständig sequenziert. Insertionssequenzen mit überlappenden Sequenzabschnitten wurden mit Hilfe einer Genome-Assembler Software wie beschrieben zusammengefügt (Adams et al., 2000; Myers et al., 2000; Venter et al., 2001). Auf diese Weise entstanden vier Sequenz-Contigs mit einer Gesamtlänge von 489.082 bp, die durch die Insertionssequenzen der beiden Klonbibliotheken 11-fach abgedeckt waren. Die Lücken zwischen den Contigs wurden durch PCR-Amplifikationen geschlossen, so dass eine ringförmige Gesamtsequenz mit einer Länge von 490.885 bp und einem G+C Gehalt von 31,56% erhalten wurde.

Die Genomsequenz von *N. equitans* wurde unter der Zugriffs-Nummer AACL01000000 bei GenBank hinterlegt.

2. Genomanalyse

Die nachfolgenden Arbeiten wurden während eines Aufenthaltes bei der Firma Diversa in Zusammenarbeit mit Dr. Elisabeth Waters durchgeführt.

2.1. Identifizierung codierender DNA Sequenzen

Proteincodierende DNA Sequenzen (CDS) ab einer Länge von 50 bp wurden mit Hilfe der Programme „Glimmer“ und „Critica“ identifiziert. Kürzere Gene wurden gefunden, indem die zwischen den vorhergesagten CDS gelegenen DNA-Sequenzen mittels „tblastn“ mit Proteinsequenzen bekannter archaeller Genome verglichen wurden. Auf diese Weise wurden 552 CDS im Genom von *N. equitans* vorhergesagt (siehe Anhang, Tab. 13). Die

durchschnittliche Länge einer CDS beträgt 827 bp. Etwa 92% des Genoms von *N. equitans* werden durch Protein-codierende DNA-Sequenzen abgedeckt.

Insgesamt wurden 38 tRNA Gene mit Hilfe der „tRNAscan-SE“ Software (Lowe und Eddy, 1997) identifiziert (siehe Anhang, Tab. 14). Die Gene der ribosomalen RNAs (5S rRNA, 16S rRNA und 23S rRNA) liegen in jeweils einer Kopie vor. Sie sind im Genom von *N. equitans* durch mehrere tausend bp voneinander getrennt und somit nicht in einem Operon angeordnet. Zusätzlich zu den oben genannten RNA Spezies wurden 14 small nucleolar-like RNAs (snoRNAs) identifiziert (David E. Graham, persönliche Mitteilung), so dass ca. 3% des *N. equitans*-Genoms für Gene stabiler RNAs codieren. Der Gesamtanteil codierender DNA (Gene stabiler RNAs und Protein-codierende DNA) beträgt für *N. equitans* somit etwa 95%.

2.2. „Codon Usage“

Basierend auf den Sequenzdaten der 552 identifizierten CDS wurde die „Codon Usage“ von *N. equitans* ermittelt (Tab. 10).

F ttt	73	S tct	27	Y tat	77	C tgt	60
F ttc	27	S tcc	12	Y tac	23	C tgc	40
L tta	42	S tca	11	* taa	50	* tga	11
L ttg	22	S tcg	9	* tag	39	W tgg	100
L ctt	10	P cct	28	H cat	81	R cgt	3
L ctc	3	P ccc	20	H cac	19	R cgc	3
L cta	19	P cca	45	Q caa	79	R cga	8
L ctg	4	P ccg	8	Q cag	21	R cgg	3
I att	34	T act	31	N aat	67	S agt	19
I atc	8	T acc	20	N aac	33	S agc	21
I ata	58	T aca	41	K aaa	74	R aga	56
M atg	100	T acg	8	K aag	26	R agg	28
V gtt	43	A gct	37	D gat	77	G ggt	28
V gtc	5	A gcc	16	D gac	23	G ggc	18
V gta	41	A gca	34	E gaa	72	G gga	31
V gtg	11	A gcg	12	E gag	28	G ggg	23

Tab. 10: Codon Usage Tabelle, errechnet aus den 552 identifizierten CDS des Genoms von *N. equitans*. In Großbuchstaben sind die 20 codierten Aminosäuren angegeben (Einbuchstabencode; * symbolisiert ein Stop-Signal), gefolgt von den codierenden Codon-Triplets. Zahlenwerte geben die Verwendung des entsprechenden Codons in Prozent an.

Alle 61 Aminosäure-codierenden Codon-Triplets sowie die drei Stop-Codons (TGA, TAG und TAA) werden verwendet. Wie aus Tab. 10 ersichtlich wird, werden jedoch Codons mit A

oder T an dritter Position bevorzugt. Dies steht in Einklang mit dem niedrigen G+C Gehalt des Genoms.

2.3. Annotierung proteincodierender Sequenzen

Die 552 identifizierten CDS wurden in Aminosäure-Sequenzen umgerechnet, und diese mittels blastp (Altschul et al., 1990) mit den in der „non-redundant protein database“ (www.ncbi.nlm.nih.gov) hinterlegten Proteinsequenzen verglichen. Die annotierten CDS wurden entsprechend ihrer physiologischen Funktion in 15 Hauptkategorien eingeteilt (zusammengefasst im Anhang, Tab. 13). Etwa zwei Dritteln der CDS konnte eine bekannte Funktion zugeordnet werden. Gene hypothetischer Proteine, die auch Homologe in anderen Archaea haben, und Gene von Proteinen mit unbekannter Funktion nehmen etwa 19% aller CDS ein, während 159 hypothetische Proteine spezifisch für *N. equitans* sind. Ein wesentlicher Anteil der funktionell zuordenbaren CDS ist an Replikation und Reparatur der chromosomalen DNA sowie an DNA-Translation, Proteinsynthese und Proteinmodifikation beteiligt. Ein weitaus geringerer Anteil der codierten Enzyme nimmt Funktionen in Stoffwechsel, Metaboliten-Transport und in der Synthese weiterer Zellbausteine, wie Coenzymen, Lipiden, Aminosäuren und Nukleotiden ein (siehe Abb. 12).

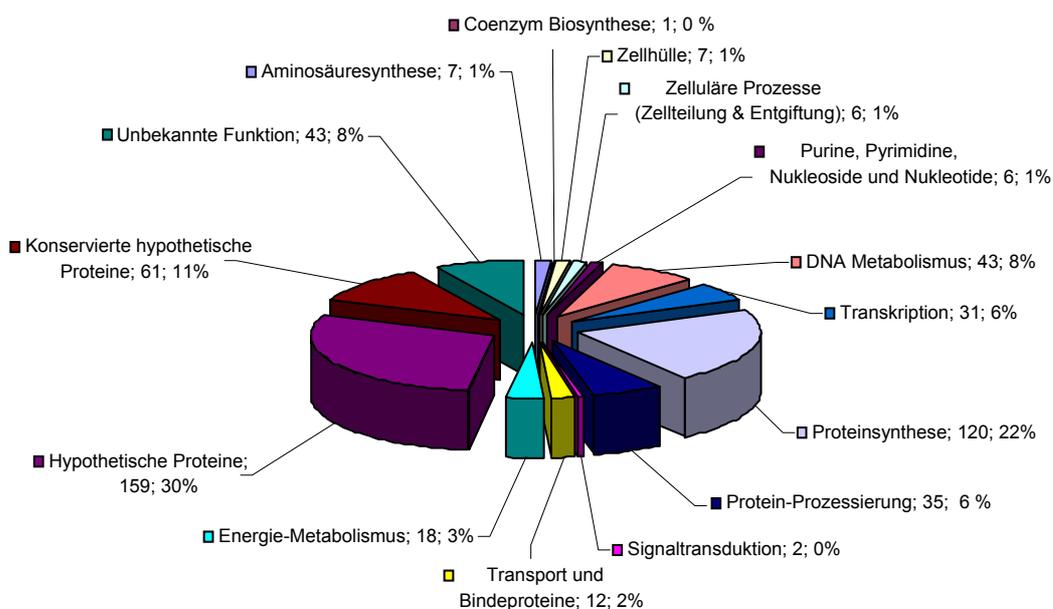


Abb. 12: Einteilung der annotierten Proteine von *N. equitans* in funktionelle Gruppen. Die Zahl der Proteine in jeder Gruppe ist angegeben, gefolgt vom prozentualen Anteil an der Gesamtzahl der Proteine. Die zugehörigen Gene sind im Anhang, Tab. 13 aufgelistet.

2.4. Zusammenfassung der Annotierungsergebnisse

2.4.1. Metabolismus und Haushaltsgene

N. equitans fehlen jegliche Gene, deren Produkte an Glykolyse, Gluconeogenese, Pentose-Phosphat Weg, Tricarbonsäure-Zyklus oder anderen bekannten Wegen der Kohlenstoffaufnahme beteiligt sind bzw. eine Energiegewinnung durch Substratkettenphosphorylierung ermöglichen würden. Neun mögliche Komponenten einer Elektronentransportkette wurden annotiert (NEQ024, NEQ049, NEQ051, NEQ084, NEQ306, NEQ321, NEQ373, NEQ382, NEQ491; vgl. Anhang, Tab. 13). Es ist jedoch unklar, auf welchen terminalen Akzeptor die Elektronen übertragen werden könnten. Weiterhin werden fünf Untereinheiten einer ATP-Synthase vom A_1A_0 -Typ codiert. Hierbei handelt es sich um die Untereinheiten A, B und D sowie um die membrangebundene Untereinheit I (die für die Ionentranslokation benötigt wird) und die Proteolipid-Untereinheit K. Die Untereinheiten C, E, F und H, die in allen bisher untersuchten archaellen Genomen codiert sind, wurden nicht gefunden.

Nahezu alle Gene, die für die *de novo* Synthese von Lipiden, Aminosäuren, Cofaktoren und Nucleotiden benötigt werden, fehlen bei *N. equitans*. Für die Synthese von Thymidin sind jedoch eine bifunktionelle dCTP-Desaminase/dUTP-Diphosphatase sowie eine Flavin-abhängige Thymidilat-Synthase vorhanden. Die Phosphorylierung von AMP und ADP kann durch eine Adenylat-Kinase katalysiert werden, und eine Nucleosiddiphosphat-Kinase ermöglicht die Umwandlung von Nucleosiddiphosphaten in -triphosphate. Ribonucleotide können möglicherweise durch eine anaerobe Ribonucleotid-Reduktase in Desoxyribonucleotide umgewandelt werden.

Nur sechs putative Transporter wurden im Genom von *N. equitans* identifiziert. Dazu zählen ein mechanosensitiver Ionenkanal, drei Transportsysteme vom ABC-Typ, ein $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Antiporter, ein Metallionen-Transporter vom MIT-Typ und ein TDT Tellurit/Dicarboxylat-Transporter. Für den Export von Proteinen steht ein Proteintranslokase-System bestehend aus SecYE, SecDF und Komponenten einer Signalpeptidase zur Verfügung. Es fehlen jedoch Protein- und RNA-Komponenten zur Erkennung von Exportsignalen, wie sie bei anderen Archaea gefunden wurden (Zwieb und Eichler, 2002).

2.4.2. Zellzyklus, DNA-Replikation, -Rekombination und -Reparatur

Die Genausstattung für die DNA-Replikation und für den Ablauf des Zellzyklus ist bei *N. equitans* ähnlich wie bei den Euryarchaeota und enthält einige Komponenten, die bei den bisher untersuchten Crenarchaeota fehlen. Dazu zählen Gene, die für zwei Histonuntereinheiten sowie für zwei Kopien der am Teilungsapparat beteiligten GTPase FtsZ codieren. Zur DNA Replikation dienen eine (bisher nur in Euryarchaeen gefundene) DNA-Polymerase II und eine DNA-Polymerase vom Typ B. Die zur Einleitung der Genom-Replikation benötigten Proteine CDC6 (= Origin recognition complex), MCM (= Replicative Helicase) und RPA (Replication protein A; = Einzelstrang-Bindeprotein) sind im Genom von *N. equitans* codiert. Zu den für die Elongationsphase der Replikation benötigten Komponenten zählen eine DNA-Primase, Replication Factor C, 3 Kopien des Sliding-clamp Proteins PCNA, eine ATP-abhängige DNA-Ligase, flap Endonuclease-1 und RNaseH zur Entfernung von Primern sowie eine Reverse Gyrase. Das Genom von *N. equitans* enthält außerdem eine Vielzahl von DNA Reparaturenzymen. Dazu gehören u.a. die Endonukleasen III, IV und V, sowie die DNA-Helicase Rad25. Das Vorhandensein des Rekombinationsproteins RadA, des Doppelstrangbruch-Reparaturenzyms Rad50, einer Holliday-Junction Resolvase und eines Einzelstrang-Bindeproteins legt nahe, dass *N. equitans* zum Genaustausch durch homologe Rekombination in der Lage ist.

2.4.3. Transkription

Die DNA-abhängige RNA-Polymerase von *N. equitans* besteht aus 14 Untereinheiten, deren Gene jedoch nicht in Operons organisiert sind. Untereinheit B ist, wie bei *Archaeoglobus fulgidus*, den methanogenen, und den extrem halophilen Archaeen gespalten. Die zur Initiation des archaeellen Transkriptionsapparates benötigten Faktoren TBP, TFB und TFE sind vorhanden. Daneben werden mindestens sieben Transkriptionsregulatoren sowie ein Transkriptions-Elongationsfaktor und ein Transkriptions-Terminationsfaktor codiert.

2.4.4. Translation

Insgesamt wurden 38 tRNA Gene gefunden. Die Gene der tRNAs für Histidin, Glutamat und Tryptophan konnten jedoch im Genom von *N. equitans* nicht nachgewiesen werden. Vier tRNA Gene (für Serin, Tyrosin, Isoleucin und Methionin) enthalten jeweils ein Intron (siehe

Anhang, Tab. 14). Zwei Kopien einer archaeellen Endoribonuklease (EndA), die das Spleißen dieser Introns katalysieren könnte, wurden ebenfalls identifiziert.

Aminoacyl-tRNA-Synthetasen werden für alle Aminosäuren mit Ausnahme von Glutamin und Asparagin codiert. Die tRNAs für diese beiden Aminosäuren werden wahrscheinlich zunächst mit Glutamat bzw. Aspartat beladen, und diese Aminosäuren anschließend durch zwei Glu-tRNA-Amidotransferasen (GatABC und GatDE) in Glutamin bzw. Asparagin umgewandelt.

Gene für 63 ribosomale Proteine sowie für die bei Archaea typischen Translations-Faktoren wurden identifiziert. Dazu zählen die Initiationsfaktoren IF-1, aIF-1A, aIF-2 (bestehend aus Untereinheiten α , β und γ), aIF-5A und aIF-6, sowie die Elongationsfaktoren EF-1 α , EF-1 β , aEF-2 und der Peptidketten Release Factor aRF.

2.4.5. Gespaltene Gene

Das Genom von *N. equitans* enthält mindestens zehn gespaltene Gene, d.h. Gene, deren Produkt durch zwei CDS codiert werden, die auf dem Chromosom mehrere tausend Basenpaare voneinander entfernt liegen (siehe Tab. 11). Die Analyse der codierten Aminosäuresequenzen mit Hilfe der Pfam Datenbank (Bateman et al., 2002) zeigte, dass die Mehrheit dieser Gene zwischen funktionellen Domänen der codierten Proteine gespalten ist (siehe Tab. 11).

Gespaltenes Gen	N-terminales Fragment	C-terminales Fragment	Abstand zwischen den CDS	Codiertes Protein zwischen funktionellen Domänen gespalten
Large helicase related protein (LHR)	NEQ003	NEQ409	134.395 bp	ja
Topoisomerase I	NEQ045	NEQ324	241.346 bp	nein
DNA-Polymerase B	NEQ068	NEQ528	83.301 bp	nein
Archaeosin-tRNA-Guanin-Transglycosylase	NEQ124	NEQ305	164.284 bp	ja
Glu-tRNA ^{Gln} -Amidotransferase (GatE)	NEQ245	NEQ396	126.409 bp	ja
Reverse Gyrase	NEQ434	NEQ318	96.625 bp	ja
RNA-Polymerase Untereinheit B	NEQ173	NEQ156	13.388 bp	ja
Hypothetisches RNA-Bindeprotein	NEQ438	NEQ506	61.647 bp	keine Angabe
Konserviertes hypothetisches Protein	NEQ495	NEQ096	139.428 bp	keine Angabe
Alanyl-tRNA Synthetase	NEQ547	NEQ211	195.194 bp	nein

Tab. 11: Gespaltene Gene von *N. equitans*.

Eine Besonderheit stellen die Untereinheiten der gespaltenen DNA-Polymerase B dar: am C-Terminus von NEQ068 sowie am N-Terminus von NEQ528 wurden Sequenzmotive eines Mini-Inteins gefunden. In Abschnitt III.D.1. wird gezeigt, dass durch den Selbstspleiß-Mechanismus des Inteins die beiden Untereinheiten der DNA-Polymerase kovalent miteinander verknüpft werden.

2.4.6. Pseudogene

Sequenzvergleiche mit homologen Proteinen aus anderen Archaeen zeigten, dass vor dem Transkriptionsstart von zwei CDS (NEQ023 und NEQ455) kurze Sequenzabschnitte vorhanden sind, bei denen es sich möglicherweise um N-terminale Abschnitte der Proteine handeln könnte, die in einem anderen Leseraster codiert sind. Beide CDS codieren jedoch für hypothetische Proteine, über deren Funktion und Struktur nichts bekannt ist. Es bleibt somit unklar, ob es sich hierbei tatsächlich um Pseudogene handelt (David E. Graham, persönliche Mitteilung).

3. Erstellung phylogenetischer Stammbäume aus Konkatemeren ribosomaler Proteine

Im Genom von *N. equitans* wurden die Gene für 63 ribosomale Proteine (26 Proteine der kleinen und 37 Proteine der großen ribosomalen Untereinheit) identifiziert. 41 der vorhandenen ribosomalen Proteine haben Homologe in allen Archaeen, deren Genom bisher sequenziert wurde, sowie in den Eukarya *Saccharomyces cerevisiae* und *Arabidopsis thaliana*. Es wird angenommen, dass die Gene von sechs dieser ribosomalen Proteine durch lateralen Gentransfer zwischen verschiedenen archaellen Spezies übertragen wurden (Matte-Tailliez et al., 2002). Die Aminosäure-Sequenzen der verbleibenden 35 ribosomalen Proteine sind entwicklungsgeschichtlich hoch konserviert und eignen sich für phylogenetische Analysen (Matte-Tailliez et al., 2002).

Die Aminosäure-Sequenzen der 35 in Tab. 12 aufgeführten ribosomalen Proteine von drei Crenarchaeota, elf Euryarchaeota, zwei Eukarya sowie von *N. equitans* wurden „aligned“, die 35 Alignments anschließend von Hand optimiert und dann zu einem einzigen Alignment zusammengefügt. Die so erhaltenen Konkatemere bestehen aus 5.319 Positionen.

Proteine der kleinen ribosomalen Untereinheit:	S2 (S0); S3AE (S3A); S3P (S3); S4E (S4); S4P (S9); S5 (S2); S6E (S6); S7 (S5); S8E (S8); S8P (S15A); S9 (S16); S10AB (S20); S11 (S14); S13P (S18); S17P (S11); S19E (S19); S19P (S15); S24E (S24)
Proteine der großen Ribosomalen Untereinheit:	L1P (L10A); L2P (L8); L3P (L3); L4 (L4); L5P (L11); L6P (L9); L10E (LP0); L13 (L13A); L14P (L23); L15 (L27A); L18P (L5); L19E (L19); L21E (L21); L22 (L17); L24P (L26); L30P (L7); L32E (L32)

Tab. 12 Liste der 35 für phylogenetische Analysen verwendeten ribosomalen Proteine. Die Bezeichnung homologer Proteine der Eukarya ist in Klammern angegeben.

Phylogenetische Stammbäume wurden mittels Maximum-Parsimony- und Maximum-Likelihood-Methoden sowie nach der Bayesian-Inference-Methode rekonstruiert. Für jede Baumberechnung wurden Bootstrap Analysen (jeweils 100 Resamplings) durchgeführt, um die Signifikanz der erhaltenen Verzweigungspunkte abschätzen zu können. In allen phylogenetischen Analysen nimmt *N. equitans* die tiefste Position innerhalb der Archaea, noch vor dem Verzweigungspunkt von Euryarchaeota und Crenarchaeota, ein. Gestützt wird diese Positionierung bei allen Berechnungen durch Bootstrap-Werte von größer 80%. Die phylogenetische Position der übrigen Organismen entspricht bei allen Berechnungen den aus 16S rRNA Sequenzdaten errechneten Baumtopologien. Die einzige Ausnahme bildet dabei *Methanopyrus kandleri*, der in den auf 16S rRNA Sequenzen basierenden Stammbäumen die tiefste Position innerhalb der Euryarchaeota einnimmt, hier jedoch zusammen mit *Methanothermobacter thermoautotrophicus* clustert. Abb. 13 zeigt einen Stammbaum, der nach der Maximum-Likelihood-Methode erstellt wurde.

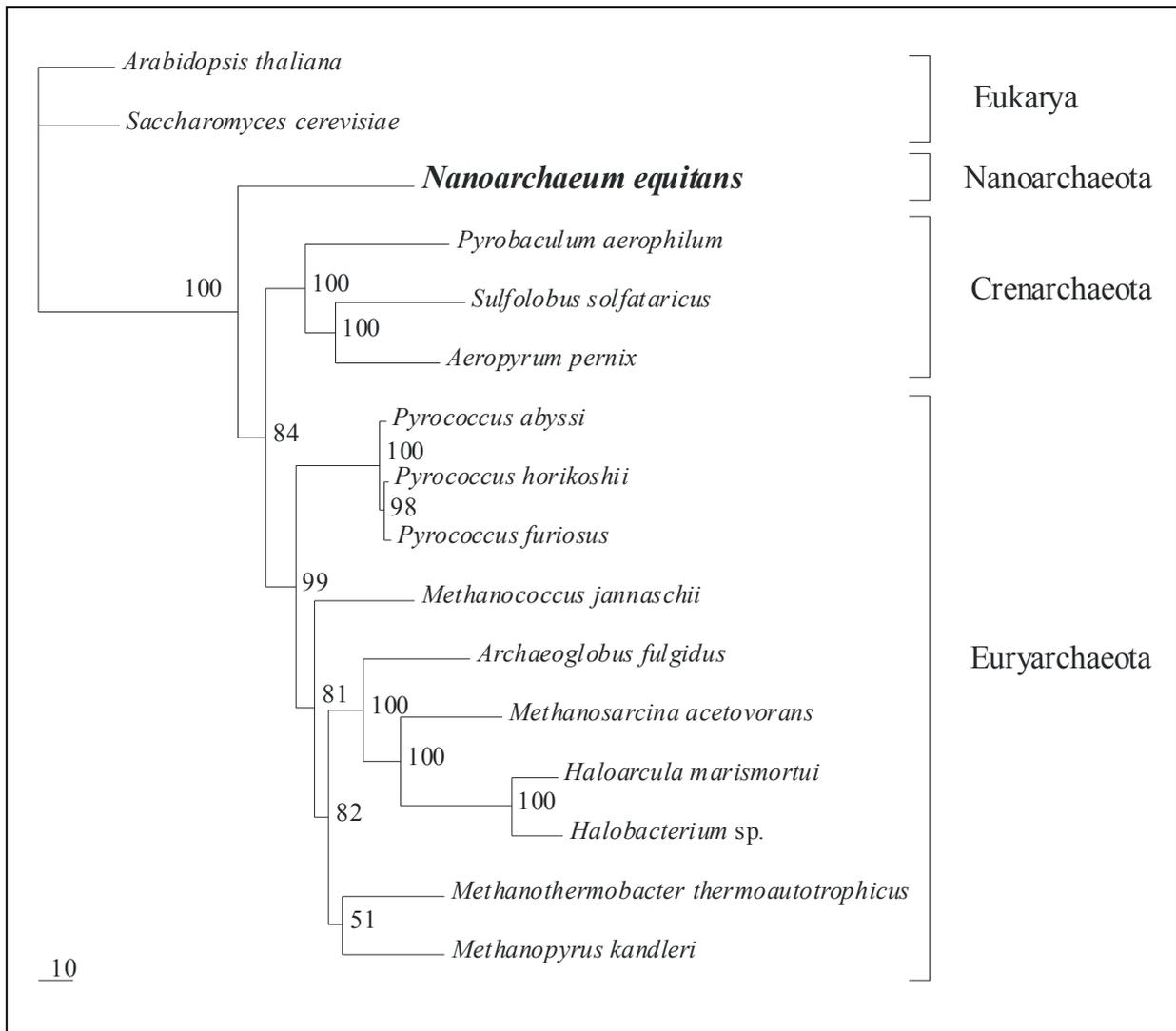


Abb. 13: Phylogenetische Position von *N. equitans* innerhalb der Archaea. Der Stammbaum wurde mit Hilfe der Maximum-Likelihood Methode erstellt und basiert auf einem Alignment von 35 ribosomalen Proteinen. Die Zahlen geben Bootstrap-Werte in Prozent an. Maßstab: 10 Austausch pro 100 Aminosäure-Positionen.

D. Experimentelle Überprüfung von Ergebnissen der Genomanalyse

1. Nachweis eines *trans*-spleißenden Mini-Inteins in der DNA-Polymerase B von *N. equitans*

1.1. Sequenzanalyse von PolN und PolC

Bei der Annotierung des Gesamtgenoms zeigte sich, dass die DNA abhängige DNA-Polymerase B von *N. equitans*, anders als bei den meisten Archaeen (mit Ausnahme von *Methanothermobacter thermoautotrophicus*; Kelman et al., 1999), nicht von einem einzelnen Gen codiert wird, sondern von zwei partialen Genen. Diese sind getrennt durch 83,3 kb und in unterschiedlicher Orientierung zueinander auf dem Genom lokalisiert (vgl. III.C.2.4.5.). Die ersten 676 Aminosäuren werden im Leserahmen NEQ068 codiert, die restlichen 253 Aminosäuren im Leserahmen NEQ528. Bei Sequenzvergleichen mit bekannten archaeellen DNA-Polymerasen lassen sich für die 98 C-terminalen Aminosäuren von NEQ068 sowie für die 31 N-terminalen Aminosäuren von NEQ528 keine homologen Bereiche erkennen (nicht gezeigt). Diese terminalen Sequenzen weisen zusammen jedoch vier in Inteinen konservierte Sequenzmotive (A, B, F und G) auf (Abb. 14). Es wurde vermutet, dass die C-terminalen Aminosäuren von NEQ068 und die N-terminalen Aminosäuren von NEQ528 die beiden Hälften eines gespaltenen Mini-Inteins darstellen, das die Genprodukte von NEQ068 und NEQ528 möglicherweise durch post-translationales, selbst-katalytisches Spleißen kovalent miteinander verbinden könnte (Waters et al., 2003). Diese Vermutung wurde in den folgenden Experimenten *in vitro* überprüft.

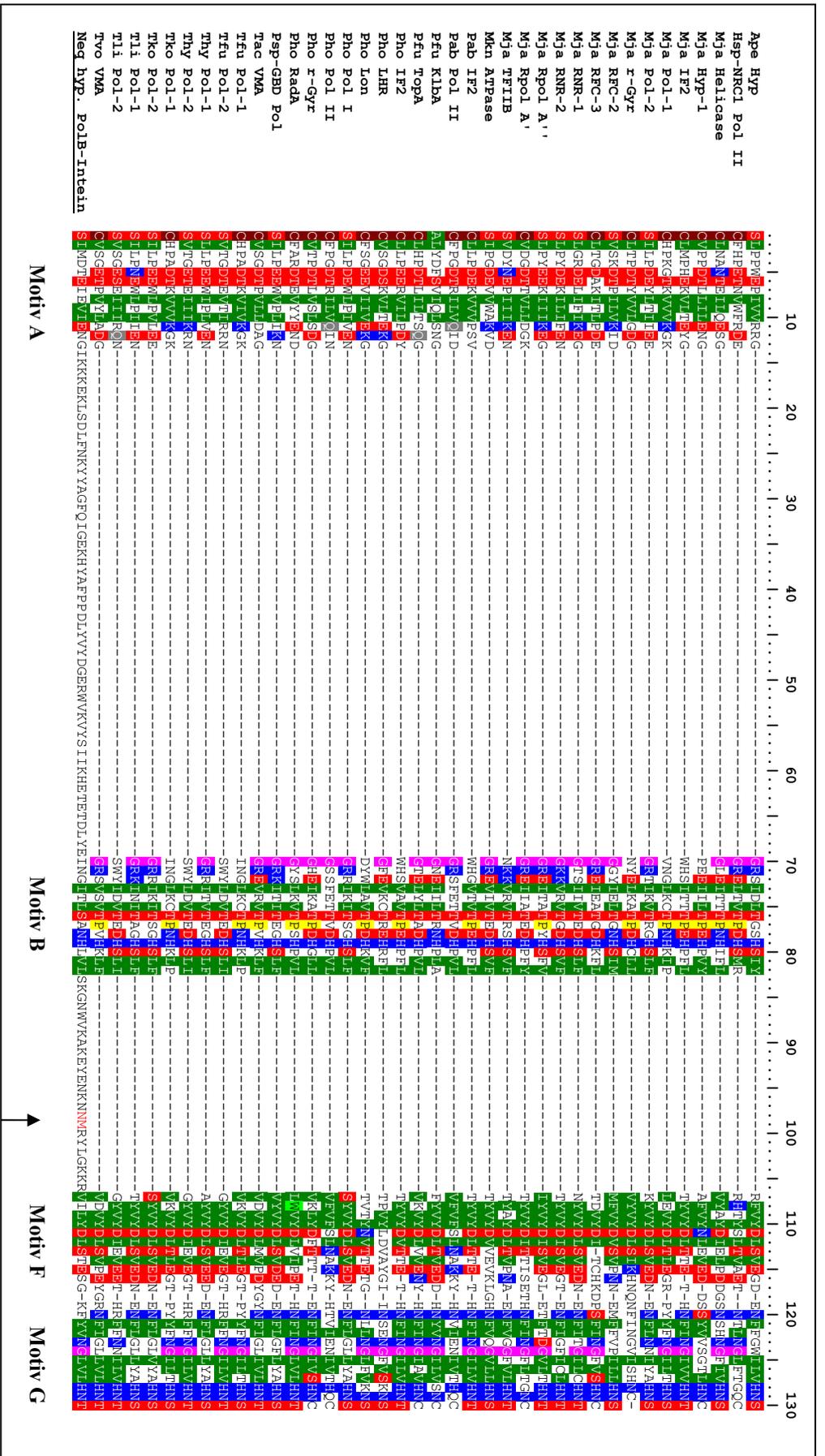


Abb. 14 Alignment der 98 C-terminalen Aminosäurereste von NEQ068 und der 32 N-terminalen Aminosäurereste von NEQ528 mit den aus archaischen Inteinen abgeleiteten Sequenzmotiven A,B,F und G. Konservierte Aminosäuren sind farblich gekennzeichnet. Position 130 entspricht der ersten Aminosäure des C-terminalen Extrems (i.d.R. Cys, Ser oder Thr). Der Pfeil kennzeichnet den Übergang von NEQ068 zu NEQ528. Sequenzdaten konservierter Inteinmotive wurden von der Intein-Datenbank Inbase (Perler, 2002) bezogen.

1.2. Klonierung von polN und polC

Von genomischer DNA aus *N. equitans* wurde der ORF NEQ068, der für die N-terminale Hälfte der DNA Polymerase B (PolN) codiert, sowie der für die C-terminale Hälfte der DNA Polymerase B (PolC) codierende ORF NEQ528, mittels PCR amplifiziert. Dazu wurden die Primer PolN_F und PolN_R, bzw. PolC_F und PolC_R verwendet (siehe Tab. 1). Die Primer wurden so konstruiert, dass 9 Nukleotide vor dem Start-Codon von NEQ068 eine *XhoI*-Schnittstelle, 10 Nukleotide nach dem Stop-Codon von NEQ068 eine *BamHI*-Schnittstelle, 7 Nukleotide vor dem Start-Codon von NEQ528 eine *BamHI*-Schnittstelle und anstelle des Stop-Codons von NEQ528 eine *XhoI*-Schnittstelle eingefügt wurde. Nach Restriktionshydrolyse der PCR-Produkte mit *BamHI* und *XhoI* wurde das Gen für PolN in den mit *BamHI/XhoI* vorgeschrittenen Expressionsvektor pET16b kloniert, und dadurch mit einem N-terminalen His-tag versehen. Das Gen für PolC wurde durch Ligation in den mit *BamHI/XhoI* vorgeschrittenen Vektor pET25b mit einem C-terminalen His-tag fusioniert. Die Plasmidinsertionssequenzen wurden zur Kontrolle vollständig sequenziert und aus den erhaltenen Sequenzen die folgenden zu erwartenden Molekulargewichte für die Fusionsproteine abgeleitet:

Rekombinantes PolN (inklusive His-tag):	701 Aminosäuren	82909,95 Da
Rekombinantes PolC (inklusive His-tag):	310 Aminosäuren	35759,88 Da

1.3. Herstellung rekombinanter Untereinheiten

1.3.1. Expression in *E. coli*

Nach Transformation der konstruierten Expressionsplasmide in den *E. coli* Stamm BL21 (DE3) und Induktion mit IPTG konnte auch nach Senkung der Inkubationstemperatur von 37°C auf 30°C bzw. 25°C sowie nach Verlängerung der Inkubationszeit von 4 auf 16 Stunden, keine Überexpression von PolN oder PolC verzeichnet werden. Erst bei Verwendung des *E. coli* Stammes RosettaTM war die Überexpression von PolN und PolC möglich. Optimale Proteinexpression wurde nach 16-stündiger Induktion bei 25°C erzielt.

1.3.2. Reinigung von PolN

Zur Reinigung von rekombinantem PolN wurden 3g Zellmasse aufgeschlossen, und der Großteil der löslichen *E. coli*-Proteine durch Inkubation bei 70°C und 90°C ausgefällt. Im Zentrifugationsüberstand war das thermostabile rekombinante Protein stark angereichert. Zur Abtrennung weiterer *E. coli* Proteine sowie zur Aufkonzentration des rekombinanten PolN folgte eine Affinitätschromatographie an Ni²⁺-NTA. Gebundenes Protein wurde mit 2 ml Elutions-Puffer (nativ) von der Säule gewaschen, in 4 Fraktionen gesammelt und diese auf einem SDS-Gel analysiert (Abb. 15). Auf dem Gel sind 2 Proteinbanden mit 83 und 75 kDa zu erkennen. Western Blot Analyse mit gegen den His-tag gerichteten Antikörpern zeigte, dass beide Proteine den His-tag enthalten (nicht gezeigt). Dies legt nahe, dass es sich bei dem größeren Protein um intaktes PolN handelt, während das kleinere Protein vermutlich ein proteolytisches Abbauprodukt von PolN ist. Die beiden ersten Eluat-Fractionen, in denen der Großteil des rekombinanten PolN enthalten war, wurden vereinigt und bei 4°C aufbewahrt. Insgesamt wurden 50 mg rekombinantes PolN aufgereinigt.

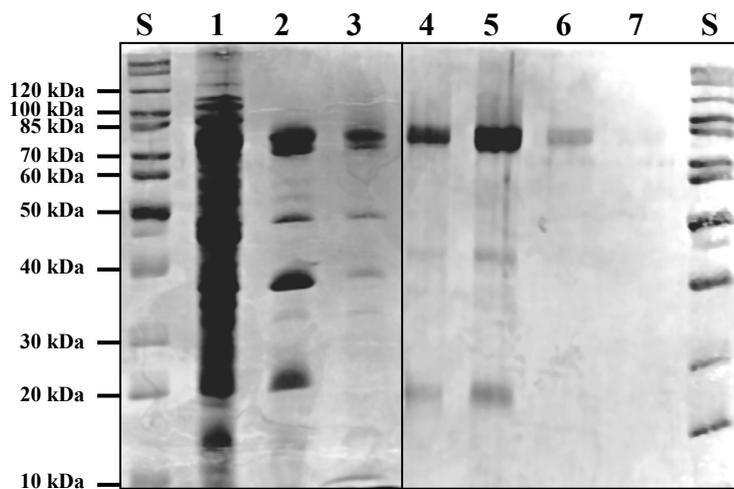


Abb. 15: Reinigungsstufen des rekombinanten PolN in einem Coomassie-gefärbten 10%-igen SDS-Polyacrylamidgel. 1: Rohextrakt, 2,3: Hitzestabiler Proteinüberstand nach Inkubation bei 70 bzw. 90°C, 4-7: Fraktionen der Ni²⁺-NTA Affinitätschromatographie, S: Molekulargewichtsstandard.

1.3.3. Reinigung von PolC

Zur Reinigung von rekombinantem PolC wurde 3g Zellmasse aufgeschlossen, und *E. coli*-Zellfragmente durch Zentrifugation entfernt. Es zeigte sich, dass rekombinantes PolC bereits nach zehnminütiger Inkubation bei 70°C ausfällt, so dass eine Vorreinigung des Zellrohextraktes durch einen Hitzeschritt nicht möglich war. Zudem war der C-terminal angefügte His-tag im nativen PolC, offenbar bedingt durch die Tertiärstruktur des Proteins, für die Bindung an Ni²⁺-NTA nicht zugänglich. Deshalb wurde der Zellrohextrakt durch Zugabe von 7,2 M Harnstoff denaturiert, und die Affinitätschromatographie an Ni²⁺-NTA unter denaturierenden Bedingungen durchgeführt. Das an die Säule gebundene Protein wurde mit 2 ml Elutionspuffer inklusive 7,2 M Harnstoff eluiert, in 4 Fraktionen gesammelt, und diese auf einem SDS-Gel analysiert (Abb. 16A). In den Eluat-Fraktionen 2, 3 und 4 sind zwei prominente Proteinbanden mit ca. 35 und 30 kDa zu erkennen. Durch Western Blot Analyse (Abb. 16B) wurde gezeigt, dass beide Proteine den His-tag enthalten, so dass es sich bei dem größeren Protein um intaktes PolC, und bei dem kleineren Protein vermutlich um ein proteolytisches Abbauprodukt von PolC handelt. Die Eluatfraktionen 3 und 4 wurden vereinigt, und eine Proteinkonzentration von 30 mg/ml bestimmt.

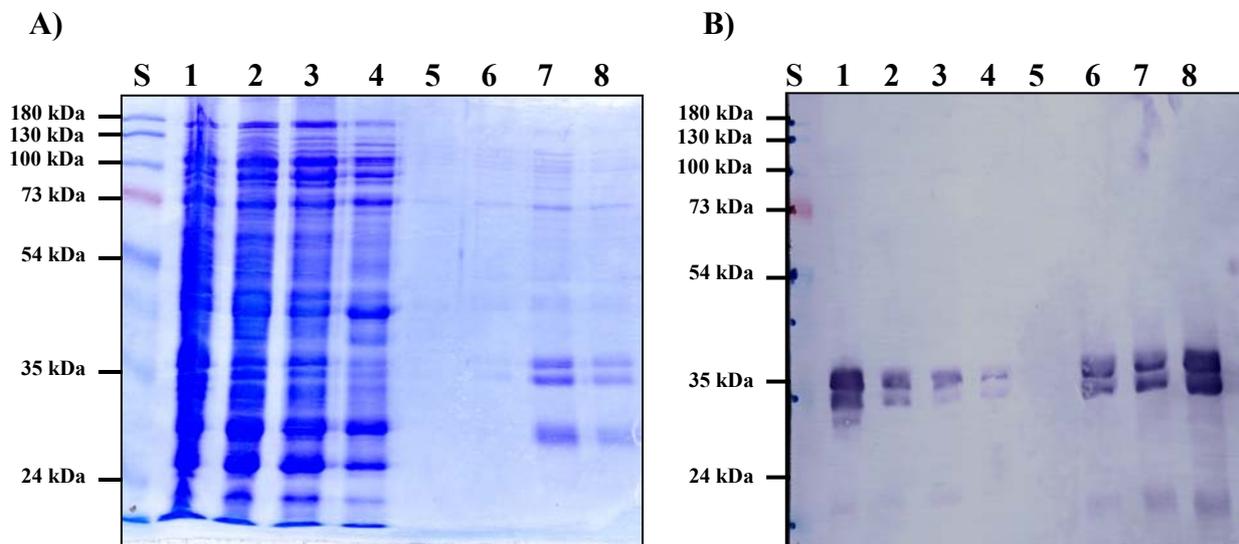


Abb. 16: Reinigungsstufen des rekombinanten PolC. A) Coomassie-gefärbtes 10%-iges SDS-Polyacrylamidgel, B) Western Blot des in A gezeigten Gels mit gegen den His-Tag gerichteten Antikörpern. 1: Rohextrakt, 2-5: Waschfraktionen der Ni²⁺-NTA-Säule, 6-8: Eluatfraktionen der Ni²⁺-NTA Affinitätschromatographie, S: Molekulargewichtsstandard.

1.4. Spleißen des gespaltenen Inteins

Zum Nachweis der Spleiß-Aktivität des gespaltenen Inteins wurden gereinigtes PolN (in nativem Elutionspuffer) und gereinigtes PolC (in Elutionspuffer mit 7,2 M Harnstoff) zu gleichen Volumenanteilen gemischt, so dass die Harnstoffkonzentration im Ansatz 3,6 M betrug. Der Ansatz wurde über Nacht bei 4°C vorinkubiert und dann durch rasches Mischen in zehnfachem Volumen Splicing-Puffer verdünnt, um die Renaturierung der Proteine zu ermöglichen. Die Spleiß-Reaktion wurde durch sofortige Inkubation des Ansatzes bei 37°C gestartet. Bei Reaktionsbeginn sowie nach 30, 60, 90, 120 und 180 min. wurden Aliquots des Ansatzes entnommen, die Reaktion in Eiswasser abgestoppt und die Proben anschließend auf einem SDS-Gel (Abb. 17A) sowie im Western Blot analysiert (Abb. 17B). Bereits 30 min. nach Reaktionsbeginn ist eine Proteinbande mit ca. 105 kDa zu erkennen, die im Verlauf der Reaktion kräftiger wird. Gleichzeitig ist eine Intensitätsabnahme der 35 kDa schweren PolC-Bande über die Zeit zu beobachten, während eine Abnahme des 83 kDa schweren PolNs, das im Ansatz im Überschuß vorhanden war, nicht zu erkennen ist. Die Größe des neu entstandenen 105 kDa schweren Proteins entspricht der vorhersagbaren Größe des Fusionsproduktes von PolN mit PolC nach dem Herausspleißen der 11,5 kDa und 3,6 Da schweren Inteinfragmente. Bei den ebenfalls auf dem Gel erkennbaren 75 kDa und 30 kDa schweren Banden handelt es sich vermutlich um proteolytische Abbauprodukte von PolN bzw. PolC, die wegen ihres vorhandenen His-tags mit aufgereinigt wurden.

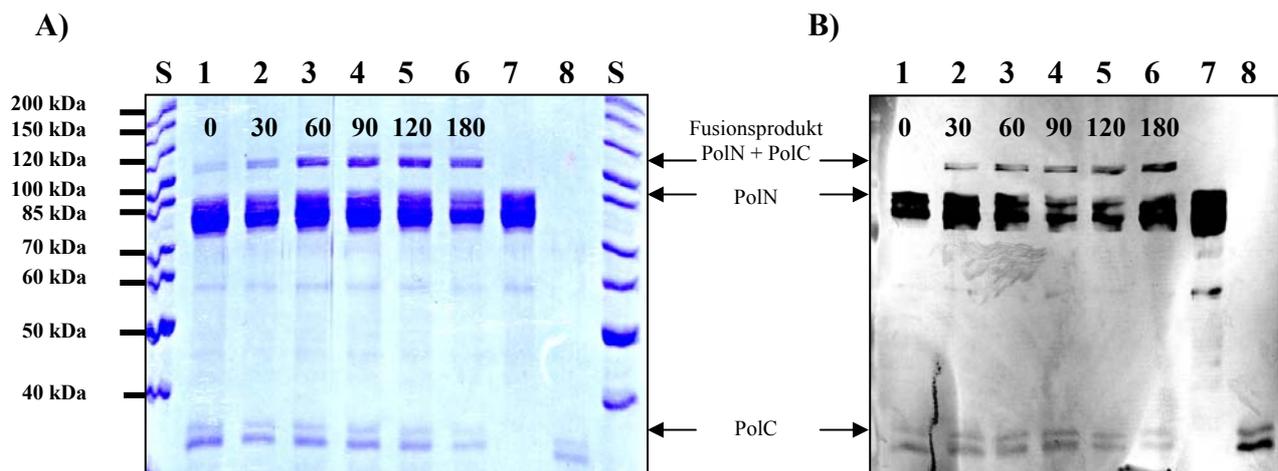


Abb. 17: Herausspleißen des Inteins und Fusion von PolN und PolC nach unterschiedlichen Inkubationszeiten. A) Coomassie-gefärbtes 8%-iges SDS-Polyacrylamidgel, B) Western Blot des in A gezeigten Gels mit gegen den His-Tag gerichteten Antikörpern. 1-6: Spleißreaktion nach 0, 30, 60, 90, 120 und 180 Minuten, 7: PolN, 8: PolC, S: Molekulargewichtsstandard.

2. Untersuchung der ATPase von *N. equitans*

Die folgenden Arbeiten wurden im Labor von Prof. Dr. Volker Müller unter Anleitung von Astrid Lingl durchgeführt.

2.1. Nachweis von ATPase-Aktivität in Membranen

N. equitans-Fermenterzellen, die wie unter II.A.4.3 beschrieben aufgereingt wurden, wurden mittels French Press aufgeschlossen, und die Membranen durch Ultrazentrifugation gewonnen. Aliquots des Zellrohextrakts, der gereinigten Membranen sowie der Cytoplasma-Fraktion wurden in den Standardtest zur Bestimmung der ATPase-Aktivität eingesetzt. Enzymaktivität konnte im Rohextrakt und in den Membranen nachgewiesen werden. Für die Membran-Fraktion wurde eine Volumenaktivität von 2 U/ml und eine spezifische Aktivität von 0,12 U/mg ermittelt. Die ATP-Spaltung in der Cytoplasma-Fraktion lag nicht signifikant über der durch die hohe Inkubationstemperatur bedingten physikalischen Hydrolyse des ATPs (Abb. 18).

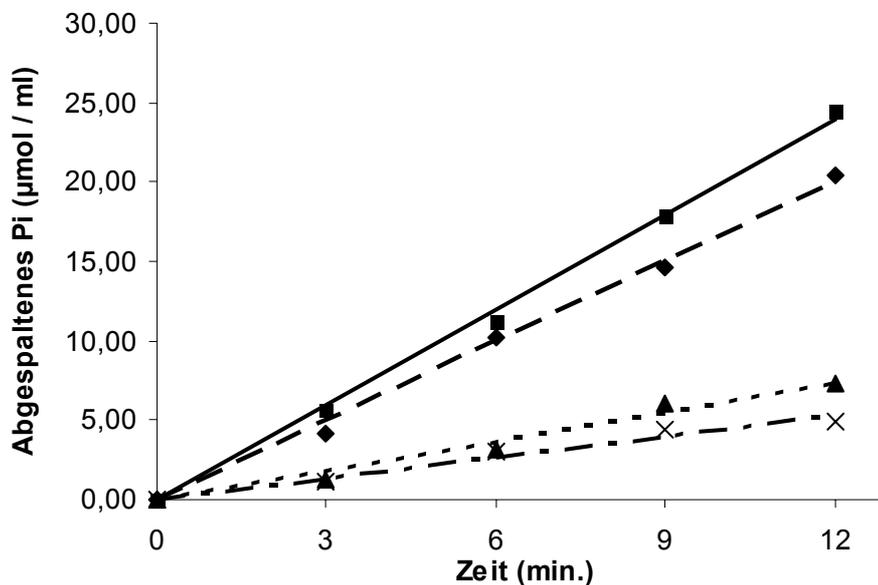


Abb. 18: Spaltung von ATP durch ATPase-Aktivität im Rohextrakt (◆), gereinigten Membranen (■) und im Cytoplasma (▲) von *N. equitans*-Zellen, sowie durch thermische Hydrolyse (×).

2.2. Temperaturabhängigkeit der ATPase

Die ATPase-Aktivität der Membran-Fraktion wurde bei verschiedenen Temperaturen getestet. Das Temperaturoptimum liegt bei etwa 90°C, und stimmt somit mit der optimalen Wachstumstemperatur des Organismus überein. Bei Temperaturen unter 60°C und über 105°C wurde keine signifikante ATP-Spaltung beobachtet (Abb. 19).

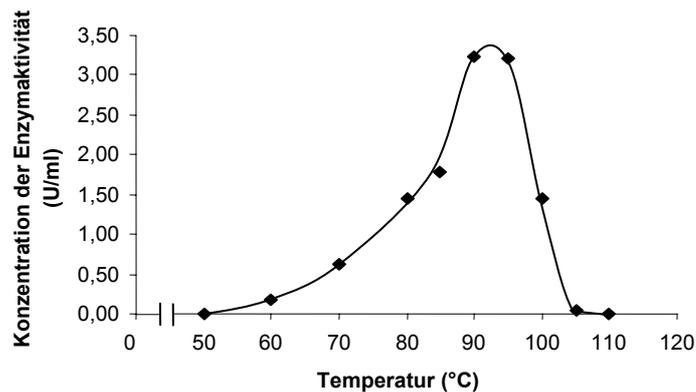


Abb. 19: Temperaturabhängigkeit der ATPase-Aktivität aus *N. equitans*-Membranen.

2.3. pH-Abhängigkeit

Die ATPase-Aktivität der gereinigten Membranen wurde im Bereich von pH 4-12 gemessen (Abb. 20). Das Optimum lag bei pH 10.

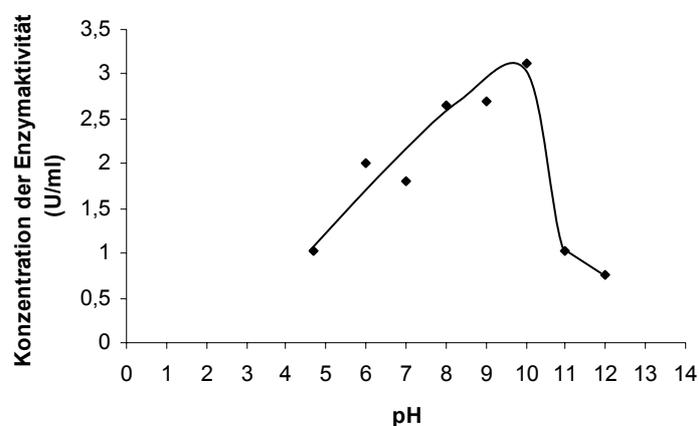


Abb. 20: Abhängigkeit der ATPase-Aktivität aus *N. equitans*-Membranen vom pH-Wert.

2.4. Abhängigkeit von Kationen und Anionen

Der Einfluss von Anionen und Kationen auf die ATPase-Aktivität wurde unter Standardbedingungen getestet. Es zeigte sich, dass durch die Anwesenheit von 10 bis 50 mM SO_3^{2-} die Aktivität um ca. 30% gesteigert werden konnte. Die Anwesenheit von 5 mM SO_4^{2-} , welches stimulierend auf andere archaelle ATPasen wirkt (Searcy und Whatley, 1982; Nanba und Mukohata, 1987), führte zu einer Hemmung der Aktivität um ca. 50%. Weiterhin zeigte sich, dass zur ATP-Hydrolyse divalente Kationen wie Mg^{2+} nötig sind. Mg^{2+} kann dabei durch Ca^{2+} , Mn^{2+} und teilweise auch Zn^{2+} ersetzt werden, wobei die Anwesenheit von Mn^{2+} zu einer 30% höheren und die Anwesenheit von Zn^{2+} zu einer 30% geringeren Aktivität gegenüber Mg^{2+} oder Ca^{2+} führt. Keine Aktivität zeigte sich bei Zugabe von Ni^{2+} oder Cu^{2+} .

2.5. Inhibitoren

Zur Ermittlung des Einflusses verschiedener spezifischer Inhibitoren archaeller ATPasen auf die ATPase Aktivität von *N. equitans* wurde in einem 1 ml Ansatz gereinigte Membranen (Endkonzentration im Ansatz: 0,075 mg/ml Protein) mit unterschiedlichen Konzentrationen von Dicyclohexylcarbodiimid (DCCD), Diethylstilbestrol (DES) bzw. dem DES Derivat Hexestrol (jeweils gelöst in Ethanol) für 30 min. bei 37°C vorinkubiert. Anschließend wurde die Freisetzung von Orthophosphat unter Standardbedingungen bestimmt. Zur Kontrolle wurde die ATPase-Aktivität in Ansätzen gemessen, die anstatt des Inhibitors nur Ethanol enthielten.

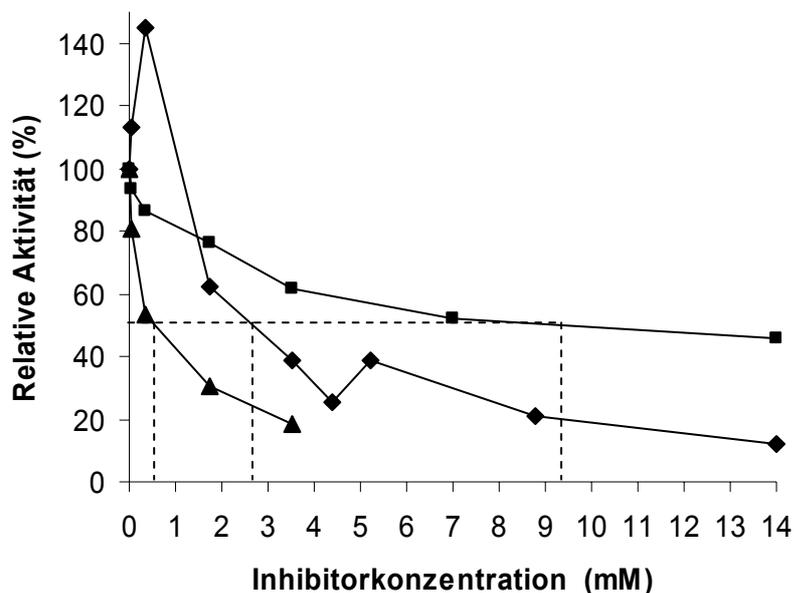


Abb. 21: Einfluß verschiedener Inhibitoren auf die Aktivität der membrangebundenen ATPase von *N. equitans*.

Die ATPase-Aktivität wurde durch DCCD (■), Hexestrol (▲) und DES (◆) gehemmt. Für jeden Hemmstoff wurde die halbmaximale Inhibitorkonzentration (I_{50}) graphisch bestimmt (siehe Text).

Die Enzymaktivität konnte durch alle drei getesteten Inhibitoren effektiv gehemmt werden. Dabei zeigte DES eine etwas schwächere Wirkung als Hexestrol. Durch DCCD, welches den Ionenfluß durch die membrangebundene ATPase-Domäne blockiert (und damit nur auf ATPasen wirkt, bei denen A₁- und A₀-Domäne noch in Verbindung stehen), konnte die Enzymaktivität nur zu maximal 45% gehemmt werden. Aus einer Auftragung der relativen Enzymaktivitäten gegen die Inhibitorkonzentration (Abb. 21) wurden die *I*₅₀-Werte zu 8 µmol Hexestrol/mg Protein, 36 µmol DES/mg Protein und 125 µmol DCCD/mg Protein bestimmt.

IV. Diskussion

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde in genomischer DNA der Co-Kultur KIN4/M ein zweites 16S rRNA Gen nachgewiesen, das sich von dem des *Ignicoccus* sp. KIN4/I unterscheidet. Vergleiche mit 16S rDNAs bekannter Mikroorganismen zeigten, dass dieses 16S rRNA Gen einem bisher unbekanntem Vertreter der Archaea zuzuordnen ist. Überraschenderweise wies das neuartige 16S rRNA Gen eine Vielzahl von Basenaustauschen auf, selbst in den als hochkonserviert geltenden Abschnitten, die gewöhnlich als Zielsequenzen für phylogenetische Sonden oder PCR-Primer genutzt werden (Hohn et al., 2002). Dadurch lässt sich erklären, weshalb diese 16S rDNA in früheren Versuchen mittels PCR nicht amplifiziert werden konnte. Trotz der Vielzahl an Mutationen entspricht die rekonstruierte Sekundärstruktur der neuen 16S rRNA dem Standard-Strukturmodell einer archaeellen 16S rRNA (Gutell et al., 1985; Woese, 1987). Mit Hilfe von Fluoreszenzfarbstoffmarkierten Oligonukleotiden, die zu Sequenzabschnitten der neuartigen 16S rRNA komplementär sind, konnten die kleinen Kokken in der Kultur KIN4/M spezifisch angefärbt und somit als bisher unbekannte Vertreter der Archaea identifiziert werden. Wegen ihrer morphologischen Eigenschaften wurde den kleinen Kokken der Name *Nanoarchaeum equitans* gegeben. Wie man aufgrund der ungewöhnlichen 16S rDNA Sequenz erwarten konnte, zeigten *N. equitans*-Zellen kein Fluoreszenzsignal mit Crenarchaeota- oder Euryarchaeota-spezifischen Oligonukleotidsonden oder mit Sonden, die bisher als Archaea-spezifisch oder universell für alle Organismen erachtet wurden.

Sowohl Sequenzvergleiche mit bekannten 16S rDNAs als auch die für die 16S rRNA von *N. equitans* vorgeschlagene Sekundärstruktur belegen, dass dieser Organismus der Domäne Archaea angehört. *N. equitans* kann jedoch keinem der drei bisher bekannten archaeellen Reiche zugeordnet werden. Die 16S rRNA Sequenz weist nur maximal 81% Übereinstimmung mit bekannten 16S rRNA Sequenzen der Euryarchaeota oder Crenarchaeota und maximal 75% Übereinstimmung mit denen der Korarchaeota auf. Der phylogenetische Abstand von *N. equitans* zu jedem dieser drei Reiche liegt damit im selben Größenbereich wie der phylogenetische Abstand der Reiche untereinander. Damit scheint es gerechtfertigt, *N. equitans* einem vierten archaeellen Reich zuzuordnen, dem der Name Nanoarchaeota gegeben wurde.

In 16S rRNA Stammbäumen, die nach Maximum-Likelihood-, Maximum-Parsimony- oder Distance-Matrix-Methoden erstellt wurden, wird *N. equitans* stets als ein isolierter, sehr tief abzweigender Ast innerhalb der archaeellen Domäne dargestellt. Der Verzweigungspunkt

variiert jedoch stark in Abhängigkeit von der verwendeten Berechnungsmethode und kann entweder an tiefster Position innerhalb der Euryarchaeota oder Crenarchaeota oder vor der Aufspaltung dieser beiden Reiche liegen. Dass die Lage des Verzweigungspunktes auch in den einzelnen Baumrekonstruktionen nur unzureichend definiert ist, kommt durch insignifikant niedrige Bootstrap-Werte bei jeder Berechnungsmethode zum Ausdruck. Ursache für die hohe Variabilität des Verzweigungspunktes ist wahrscheinlich zum einen das Fehlen ausreichend ähnlicher Vergleichssequenzen und zum anderen die Tatsache, dass zahlreiche Austauschereignisse auch in hochkonservativen Bereichen der 16S rRNA Sequenz stattgefunden haben, die sich in den verschiedenen Baumberechnungsverfahren unterschiedlich stark auswirken. Der große phylogenetische Abstand zu den nächstverwandten Sequenzen kann bei Baumrekonstruktionen zudem zu Artefakten in Form langer, tief abzweigender Äste führen (Felsenstein, 1978; Hendy und Penny, 1989). Gut belegt ist dies am Beispiel der Microsporidia, die wegen ihrer ungewöhnlichen 18S rRNA Sequenz im phylogenetischen Baum an tiefster Position innerhalb der Eukarya abzweigen, jedoch aufgrund anderer phylogenetischer und physiologischer Merkmale eindeutig den Fungi angehören (Germot et al., 1997; Hirt et al., 1999). Somit erscheint die phylogenetische Position von *N. equitans* im 16S rRNA Stammbaum derzeit unsicher.

Neben ribosomalen RNAs wurden in den letzten Jahren auch die Aminosäure-Sequenzen verschiedener Proteine zur Untersuchung der evolutionären Verwandtschaft von Mikroorganismen verwendet. Als besonders geeignet für solche Analysen haben sich in jüngster Zeit konkatenierte Alignments ribosomaler Proteine erwiesen (Wolf et al., 2001; Matte-Tailliez et al., 2002; Snel et al., 1999), weil deren Gene besonders selten durch lateralen Gentransfer zwischen verschiedenen Organismen ausgetauscht werden (Wolf et al., 2001). Um die phylogenetische Position von *N. equitans* weiter zu untersuchen, wurden Stammbäume von Konkatemeren ribosomaler Proteinsequenzen nach der Maximum-Likelihood-, Maximum-Parsimony- und der Bayesian-Inference-Methode berechnet. In allen Baumrekonstruktionen nimmt *N. equitans*, gestützt durch hohe Bootstrap-Werte, die tiefste Position innerhalb der archaeellen Domäne ein, noch vor der Aufspaltung von Cren- und Euryarchaeota. Dieses Ergebnis zeigt, auch gestützt durch die auf 16S rRNA Sequenzen beruhenden Untersuchungen, dass es sich bei den Nanoarchaeota um ein sich früh innerhalb der archaeellen Domäne abspaltendes Reich handelt. Von Nachteil ist bei dieser Methode jedoch, dass sich die verfügbaren Sequenzdaten ribosomaler Proteine nur auf Organismen beschränken, deren Gesamtgenom sequenziert wurde. Die Einbeziehung von Vertretern der

Korarchaeota in die Baumberechnungen war somit nicht möglich, könnte aber einen Einfluss auf die phylogenetische Position von *N. equitans* haben.

Bei Anzucht der Co-Kultur aus *Ignicoccus* sp. KIN4/I und *N. equitans* in Serumflaschen oder im Großmaßstab in 50 l- bzw. 300 l-Fermentern unter autotrophen Bedingungen und bei geringer Durchgasungsrate (ca. 1 l/min H₂/CO₂) liegt die Endzellkonzentration sowohl der *Ignicoccus*- als auch der *N. equitans*-Zellen zwischen 1x10⁷ und 3x10⁷ Zellen pro ml. Durchschnittlich ist dabei jede *Ignicoccus*-Zelle von zwei *N. equitans*-Zellen besetzt. Starke Durchgasung der Fermenter-Kulturen mit ca. 20 l/min H₂/CO₂ oder H₂/N₂/CO₂ führte dagegen zu einer circa zehnfach höheren Endzellkonzentration von *N. equitans*, während die Endzahl der *Ignicoccus*-Zellen unverändert blieb. Gleichzeitig kann unter diesen Bedingungen in der spätlogarithmischen Wachstumsphase das Auftreten einer großen Zahl freier *N. equitans*-Zellen beobachtet werden. Das verbesserte Wachstum von *N. equitans* ist möglicherweise auf das durch die starke Durchgasung bedingte Austreiben von H₂S, dem metabolischen Endprodukt von *Ignicoccus*, zurückzuführen. Das Auftreten der freien *N. equitans*-Zellen ist dagegen weitestgehend unverstanden. Denkbar wäre eine passive Ablösung als Folge von Scherkräften, verursacht durch die starke Durchgasung. Auch der milde Einsatz von Ultraschall oder niedrige Konzentrationen von SDS führen zur Ablösung der *N. equitans*-Zellen, was für eine relativ schwache Anheftung an die *Ignicoccus*-Zellen spricht.

Die obligate Abhängigkeit von *N. equitans* zu *Ignicoccus* sp. KIN4/I deutet auf ein parasitisches oder möglicherweise symbiontisches Verhältnis zwischen diesen beiden Organismen hin. Symbiontische Vertreter innerhalb der Archaea wurden zuerst in den Ordnungen der *Methanobacteriales* und der *Methanomicrobiales* gefunden. Hierbei handelt es sich um Endosymbionten von Protozoen (Embley und Finlay, 1994). Bei den Crenarchaeota wurde bis jetzt lediglich das nicht kultivierbare *Cenarchaeum symbiosum* beschrieben, das in einem Schwamm nachgewiesen wurde (Preston et al., 1996). Alle diese symbiontischen Archaeen sind mesophil oder psychrophil; hyperthermophile Symbionten oder Parasiten waren bislang unbekannt. Auch innerhalb der Bacteria sind viele obligat symbiontische oder parasitische Organismen bekannt, wie beispielsweise die mit Insekten in Symbiose lebenden Gattungen *Buchnera* und *Wigglesworthia* sowie die obligat parasitischen Vertreter der Gattungen *Mycoplasma*, *Rickettsia*, *Treponema* und *Borrelia*. Die Genome vieler dieser Bakterien sind vor allem aufgrund ihrer medizinischen Bedeutung sequenziert und detailliert untersucht worden (Fraser et al., 1995; Fraser et al., 1997; Andersson et al.,

1998; Fraser et al., 1998; Shigenobu et al., 2000; Akman et al., 2002). Kennzeichnend für diese Organismen ist, dass sie im Zuge der Anpassung an ihren Wirtsorganismus eine Vielzahl von metabolischen und biochemischen Fähigkeiten verloren haben. Das äußert sich auch in den geringen Genomgrößen dieser Organismen. So besitzt beispielsweise *Mycoplasma genitalium* mit 590 kbp das bislang kleinste bei einem Prokaryonten bekannte Genom (Fraser et al., 1995).

Das Genom von *N. equitans* ist mit circa 490 kbp noch um 100 kbp kleiner als das von *M. genitalium*. Die Auswertung der Genomdaten lieferte weitere Belege für die obligat parasitische oder symbiontische Lebensweise von *N. equitans*. Wie bei *Mycoplasma genitalium*, *Rickettsia prowazekii* und *Treponema pallidum* fehlen bei *N. equitans* nahezu alle bekannten Gene, die zur *de novo* Synthese von Aminosäuren, Nukleotiden und Cofaktoren benötigt werden. Zudem fehlen *N. equitans* Gene, die für Enzyme der Lipidsynthese codieren. Das ist beispielsweise auch bei *Buchnera* sp. APS und teilweise bei *M. genitalium* der Fall (Shigenobu et al., 2000; Fraser et al., 1995). Demnach ist *N. equitans* wahrscheinlich darauf angewiesen, diese Substanzen von seinem Wirt zu beziehen. Dafür sprechen auch erste experimentelle Ergebnisse, wie beispielsweise die Analyse der Zellmembranen von *Ignicoccus* sp. KIN4/I und *N. equitans*. Diese hat gezeigt, dass die in den Membranen der beiden Organismen enthaltenen Lipide qualitativ identisch sind (Jahn, 2003).

Unverstanden bleibt dagegen die Art der Energiegewinnung von *N. equitans*. Es konnten keine Gene gefunden werden, die für bekannte Enzyme der Glycolyse, des Pentose-Phosphat-Wegs, des Tricarbonsäure-Zyklus oder anderer bekannter ATP liefernder Stoffwechselwege codieren. Darin unterscheidet sich *N. equitans* von anderen Parasiten mit kleinen Genomen. Während beispielsweise *M. genitalium* oder *T. pallidum* durch Substratkettenphosphorylierung Energie gewinnen (Fraser et al., 1995; Fraser et al., 1998), nutzen *Buchnera* sp. APS und *R. prowazekii* Elektronentransportphosphorylierung zur ATP-Synthese (Shigenobu et al., 2000; Andersson et al., 1998). Bei *N. equitans* wurden ebenfalls einige hypothetische Komponenten einer Elektronentransportkette identifiziert, die vermuten lassen, dass *N. equitans* möglicherweise einen Ionengradienten zur Energiegewinnung erzeugen kann. Daneben wurden fünf Gene gefunden, die für die katalytischen Untereinheiten A und B, den „Stiel“ (Untereinheit D) und die membrangebundenen Komponenten (Untereinheiten I und K) einer archaellen ATP-Synthase codieren. Diese minimale ATPase ist wesentlich einfacher gebaut als die bisher bekannten archaellen ATPasen, die wie das aus *Methanococcus jannaschii* gereinigte Enzym (Lingl et al., 2003) aus mindestens neun Untereinheiten bestehen. Erste Experimente sprechen dafür, dass die ATPase von *N. equitans*

dennoch katalytisch aktiv ist. So wurde in gereinigten Membranen von *N. equitans* eine ATP-spaltende Enzymaktivität nachgewiesen, deren Temperatur-Optimum bei 90°C und deren pH-Optimum bei pH 10 liegt. Diese Aktivität konnte durch verschiedene spezifische ATPase-Inhibitoren gehemmt werden, wodurch ausgeschlossen wurde, dass der ATP-Verbrauch auf andere membrangebundene Enzyme wie beispielsweise ABC-Transporter zurückzuführen ist. Ähnlich wie bei anderen A-Typ ATPasen wurde die Enzymaktivität durch Sulfit gesteigert und war von der Anwesenheit divalenter Kationen wie Mg^{2+} , Mn^{2+} , Ca^{2+} und Zn^{2+} abhängig (Inatomi, 1986; Hochstein und Stan-Lotter, 1992; Dirmeier et al., 2000). Zukünftige Versuche müssen noch zeigen, ob die ATPase von *N. equitans* auch als Synthase fungieren kann und damit in der Lage ist, einen Protonen- (oder Natriumionen-) Gradienten zur Synthese von ATP zu nutzen.

Von einigen parasitischen Mikroorganismen, wie beispielsweise *Rickettsia*, *Chlamydia* oder dem obligat parasitischen Eukaryonten *Encephalitozoon cuniculi*, ist bekannt, dass sie in der Lage sind, ATP direkt von ihrer Wirtszelle zu beziehen (Andersson et al., 1998; Stephens et al., 1998; Katinka et al., 2001). In Anbetracht der wenigen Gene, die für einen eigenen Metabolismus sprechen, wäre das auch für *N. equitans* denkbar. Gene, die für eine bekannte ADP/ATP Translokase codieren, konnten jedoch nicht identifiziert werden. Obwohl *N. equitans* in der Lage sein muss, eine Vielzahl unterschiedlicher Schlüsselmetabolite von seinem Wirt zu beziehen, wurden lediglich die Gene von sechs membrangebundenen Transportern identifiziert. Auch wenn man davon ausgeht, dass einige dieser Enzyme, ähnlich wie viele der bei *M. genitalium* gefundenen Transporter, verschiedene strukturverwandte Substrate erkennen können (Paulsen et al., 1998), erscheint diese Zahl nicht ausreichend, um alle benötigten Metabolite zu importieren. Wie der Stofftransport von *Ignicoccus* zu *N. equitans* funktioniert, sollte daher Gegenstand zukünftiger Untersuchungen sein. Ob es sich bei *N. equitans* um einen symbiontischen oder rein parasitischen Organismus handelt, kann anhand der Genomsequenz nicht mit letzter Gewissheit geklärt werden. Anders als bei *Buchnera* sp. APS, die ebenfalls von ihrem Blattlaus-Wirt Nukleotide, Cofaktoren, Lipide und Metabolite bezieht, ihren Wirtsorganismus aber gleichzeitig mit essenziellen Aminosäuren versorgt (Shigenobu et al., 2000), lässt das Genom von *N. equitans* auf keinen offensichtlichen Nutzen für *Ignicoccus* schließen. Unter Laborbedingungen ist *Ignicoccus* sp. KIN4/I in seinem Wachstum nicht von *N. equitans* abhängig. Man kann jedoch nicht endgültig ausschließen, dass die Anwesenheit von *N. equitans* im natürlichen Biotop für seinen Wirt von Vorteil ist.

Im Gegensatz zu der geringen Zahl von „Haushaltsgenen“ besitzt *N. equitans* einen allem Anschein nach vollständigen Satz von Genen, die für eine „Informationsverarbeitung“ und einen Zellzyklus benötigt werden. Folglich sollte dieser Organismus zur eigenständigen Genomreplikation, Genexpression, Proteinsynthese und Zellteilung befähigt sein. Anders als die meisten bekannten Mikroorganismen mit reduzierten Genomen ist *N. equitans* mit einer Vielzahl von anscheinend intakten DNA-Reparatur- und Rekombinationsenzymen ausgestattet. Aufgrund der hohen Wachstumstemperatur von 90°C, bei der es vermehrt zu Schädigungen der DNA, beispielsweise durch Strangbrüche, hydrolytische Desaminierung von Cytosin und Adenin, hydrolytische Depurinierung, Oxidation von Guanin oder Methylierungen von Basen und Phosphatresten kommt (Lindahl, 1993), könnte der Verlust von Reperaturenzymen für *N. equitans* letal sein (Grogan, 2000).

Die für Replikation und Zellzyklus benötigte Enzymausstattung ähnelt bei *N. equitans* größtenteils der von Euryarchaeota und enthält Komponenten, die bei den bisher untersuchten Vertretern der Crenarchaeota fehlen. Dazu zählen DNA Polymerase II (Cann et al., 1998), Histone und zwei Kopien der GTPase FtsZ, die bei der Zellteilung von Euryarchaeota und Bacteria eine wichtige Rolle spielt (Bernander, 2000). Andere Eigenschaften des *N. equitans* Genoms sind dagegen typischer für Crenarchaeota, wie beispielsweise das Vorhandensein von Introns in vier tRNA Genen (David E. Graham, persönliche Mitteilung). Dies steht im Einklang mit den phylogenetischen Untersuchungen, die für eine frühzeitige Abspaltung von *N. equitans* von der gemeinsamen Entwicklungslinie von Cren- und Euryarchaeota sprechen. Überraschenderweise konnten die Gene dreier tRNAs (für Glutamat, Histidin und Tryptophan) im Genom von *N. equitans* nicht nachgewiesen werden. Möglicherweise besitzen diese tRNAs ungewöhnliche Sequenzen oder Sekundärstrukturen und wurden deshalb von dem verwendeten Suchalgorithmus nicht erkannt. Es wäre aber auch denkbar, dass *N. equitans* die fehlenden tRNAs von *Ignicoccus* bezieht oder dass einzelne tRNAs beispielsweise durch unterschiedliche Nukleotidmodifikationen oder durch Basenaustausche im Anticodon eine duale Aminosäure-Spezifität erhalten, wie es bei den Mitochondrien von einigen Protozoen oder von Beuteltieren der Fall ist (Kapushoc et al., 2000; Morl et al., 1995).

Die Genausstattung von *N. equitans*, die für Enzyme der Replikation, Transkription, Translation, DNA-Reparatur und RNA-Modifikation codiert, entspricht weitestgehend der von rezenten Archaeen. Das Fehlen von Genen des Metabolismus und von primären Biosynthesewegen, von denen man annimmt, dass sie bereits im letzten gemeinsamen

Vorfahren aller Archaea vorhanden waren (Woese, 1998; Lazcano und Miller, 1999), spricht für die sekundäre Reduktion des Genoms. Genomreduktion ist ein bei obligat parasitischen oder symbiontischen Mikroorganismen häufig beobachtetes Phänomen. Derartige Reduktionsprozesse können verstärkt auftreten, wenn die geringe Genomgröße Selektionsvorteile wie beispielsweise eine schnellere Genomreplikation oder eine Verkleinerung des Zellvolumens mit sich bringt (Andersson und Kurland, 1995). Ein weiterer Grund wird darin gesehen, dass solche Organismen häufig in kleinen Populationen leben und daher kaum Gelegenheit zum Austausch genetischer Information durch horizontalen Gentransfer haben (Moran, 1996). Mutationen können deshalb weniger häufig durch homologe Rekombination rückgängig gemacht werden, so dass sich im Genom dieser Organismen Deletionsmutationen anhäufen. Dieser Effekt, der als „Müller’s Sperrrad“ bezeichnet wird, wird oft zusätzlich durch den Verlust von DNA-Reperaturenzymen verstärkt (Moran und Wernegreen, 2000). Auf diese Weise inaktivierte Gene bleiben in Form sogenannter „Pseudogene“ noch eine gewisse Zeit erhalten, bevor sie im Laufe der Evolution durch weitere Deletionsereignisse aus dem Genom entfernt werden. Während beispielsweise bei *R. prowazekii* etwa 70% des Genoms aus nicht-codierenden Sequenzen oder Pseudogenen besteht (Andersson und Andersson, 2001), wurden bei *N. equitans* lediglich zwei hypothetische Pseudogene gefunden. Mit einem codierenden Anteil von 95% zählt das Genom von *N. equitans* sogar zu den kompaktesten der bisher bekannten mikrobiellen Genome. Die geringe Anzahl von Pseudogenen und der hohe Anteil codierender DNA lassen vermuten, dass für *N. equitans* der Prozess der Genomreduktion schon seit längerer Zeit abgeschlossen und damit das Genom aus evolutionärer Sicht stabil ist.

Reduzierte Genome obligater Parasiten oder Symbionten weisen häufig die Spuren zahlreicher Genomumordnungen in Folge interchromosomaler Rekombinationsereignisse, Gendeletionen und -inversionen auf. Auch im Genom von *N. equitans* finden sich Hinweise auf solche Prozesse. Dazu zählt beispielsweise, dass die Gene der ribosomalen RNAs nicht in einem Operon angeordnet sind, sondern sich, ähnlich wie bei verschiedenen *Rickettsia* und *Mycoplasma* Spezies, mehrere tausend Basenpaare entfernt voneinander auf dem Genom befinden (Andersson et al., 1999; Chen und Finch, 1989; Taschke und Herrmann, 1986). Auch andere Gene, die üblicherweise in hochkonservierten Gen-Clustern organisiert sind, wie z.B. die Gene der ribosomalen Proteine, ATPase Untereinheiten oder RNA-Polymerase Untereinheiten, sind im Genom von *N. equitans* weit verstreut. Dies kann als Beleg für eine Reihe von Genomumordnungen interpretiert werden (Andersson und Kurland, 1998).

Eine Besonderheit stellt die große Zahl gespaltener Gene im Genom von *N. equitans* dar. Dabei handelt es sich um Gene, deren Produkt von zwei Leserahmen codiert wird, die auf dem Genom durch mehrere tausend Basenpaare getrennt sind. In den meisten verfügbaren archaellen Genomen werden fusionierte Versionen dieser Gene codiert. Da es sich bei den Produkten der gespaltenen Gene sehr häufig um essenzielle Komponenten der Transkriptions- oder Translationsmaschinerie handelt, kann man davon ausgehen, dass diese Gene exprimiert werden und funktionelle Untereinheiten der entsprechenden Enzyme bilden. Diese Annahme konnte von Ivan Ahel am Beispiel der gespaltenen Alanyl-tRNA-Synthetase bestätigt werden, deren separat exprimierte Untereinheiten katalytisch inaktiv sind, gemeinsam aber ein aktives Enzym bilden (Waters et al., 2003). Bei mindestens der Hälfte aller im *N. equitans* Genom gefundenen gespaltenen Gene liegt die Spaltstelle zwischen funktionellen Domänen der codierten Proteine. Wenn man davon ausgeht, dass moderne Multi-Domänen Proteine durch die Fusion der einzelnen Domänen auf Genebene entstanden sind (Doolittle, 1978; Gilbert, 1987), könnten zumindest einige der gespaltenen Gene von *N. equitans* für evolutionäre Vorstufen komplexer Proteine codieren. Hier könnte die gespaltene Reverse Gyrase von *N. equitans* von besonderem Interesse sein. Man geht davon aus, dass dieses Enzym, das bisher ausschließlich bei hyperthermophilen Organismen gefunden wurde (Forterre, 2002) und die Bildung positiver Supercoils in DNA katalysiert, durch die Fusion einer Helicase- mit einer Topoisomerase-Domäne entstanden ist (Confalonieri et al., 1993; Forterre, 1996). Es wurde spekuliert, dass die Fusion beider Domänen eine Voraussetzung für die Entstehung der hyperthermophilen Lebensweise war, die demnach sekundär entstanden wäre (Forterre et al., 1995; Forterre et al., 2000). In Anbetracht der tiefen phylogenetischen Position von *N. equitans* könnte die Anwesenheit einer Reversen Gyrase, die aus einer separat codierten Helicase- und Topoisomerase-Domäne besteht, dagegen für eine entwicklungsgeschichtlich frühe Entstehung der Hyperthermophilie sprechen.

Einige der gespaltenen Gene von *N. equitans* könnten andererseits auch sekundär, als Folge von Mutationen, Insertionen oder Genomumordnungen entstanden sein (Stoltzfus et al., 1997). Dazu zählen beispielsweise die Gene für Topoisomerase I, Alanyl-tRNA-Synthetase oder DNA-Polymerase B, bei denen die Spaltstelle innerhalb funktioneller Proteindomänen liegt.

Während die meisten Produkte gespaltener Gene in *N. equitans* Untereinheiten funktioneller Enzyme zu bilden scheinen, die nicht kovalent miteinander verknüpft sind, stellt die gespaltene DNA-Polymerase B diesbezüglich eine Ausnahme dar. Dieses Enzym wird bei *N. equitans* von den zwei Leserahmen NEQ068 und NEQ528 codiert, die auf dem Genom

getrennt durch 83,3 kb und in unterschiedlicher Orientierung zueinander angeordnet sind. Beide Genprodukte besitzen an ihren C-terminalen (NEQ068) bzw. N-terminalen (NEQ528) Enden zusätzliche Aminosäuresequenzen, die zusammengesetzt ein 129 Aminosäurereste langes Mini-Intein ergeben. Als Inteine bezeichnet man Peptidsequenzen, die „in-frame“ in der Sequenz eines Vorgängerproteins eingebettet sind, sich in einer post-translationalen Spleißreaktion autokatalytisch aus diesem Protein herausschneiden und dabei die beiden als Exteine bezeichneten Hälften des Proteins durch eine Peptidbindung miteinander verknüpfen (Perler et al., 1994). Die meisten der circa 150 bisher bei Bakterien, Archaeen und Eukaryonten gefundenen Inteine (Perler, 2002) haben Längen von 400 bis 500 Aminosäureresten und besitzen zusätzlich eine Homing-Endonukleaseaktivität, die sie zu mobilen genetischen Elementen macht, die sich nach horizontalem Transfer in ein Empfänger-genom integrieren können. Fehlt diese Homing-Endonuklease, spricht man von einem Mini-Intein (Derbyshire et al., 1997). Die Sequenzen bekannter Mini-Inteine weisen untereinander nur wenig Sequenzübereinstimmung auf, mit Ausnahme von vier Sequenzmotiven, die zu einem geringen, aber signifikanten Maß konserviert sind (Perler et al., 1997; Duan et al., 1997; Derbyshire et al., 1997; Klabunde et al., 1998; Shingledecker et al., 1998). Diese vier Motive A, B, F und G wurden in den beiden Sequenzhälften des Mini-Inteins von *N. equitans* identifiziert, wobei sich die Motive A und B auf dem N-terminalen und die Motive F und G auf dem C-terminalen Fragment befinden. Es konnte bereits an einigen Beispielen *in vivo* und *in vitro* gezeigt werden, dass man Inteine künstlich in zwei Teile spalten kann, ohne dass diese dabei ihre Spleiß-Aktivität verlieren (Southworth et al., 1998; Shingledecker et al., 1998; Mills et al., 1998; Wu et al., 1998b). Ein natürlich vorkommendes gespaltenes Intein mit *trans*-spleißender Aktivität wurde jedoch erst einmal im DnaE Protein des Cyanobakteriums *Synechocystis* sp. PCC6803 beschrieben (Wu et al., 1998a). Durch *in vitro* Experimente mit rekombinanten Genprodukten von NEQ068 und NEQ528 konnte gezeigt werden, dass auch die beiden Teile des gespaltenen Mini-Inteins von *N. equitans* die kovalente Verknüpfung der zwei Polymerase-Hälften katalysieren und dabei selbst aus der Proteinsequenz herausgespleißt werden. Ob die kovalente Verknüpfung der beiden Polymerasehälften eine Voraussetzung für die katalytische Aktivität dieses Enzyms ist, wurde nicht experimentell untersucht. Das Intein unterbricht jedoch ein als Region I bezeichnetes, in der „Hand“-Domäne von Typ B DNA-Polymerasen hochkonserviertes Sequenz-Motiv (Wang et al., 1989). Bei der DNA-Polymerase B von *Thermococcus litoralis*, die ein 400 Aminosäurereste langes (nicht-unterbrochenes) Intein an exakt der gleichen Position enthält, ist das Spleißen Voraussetzung für die katalytische Aktivität der DNA-

Polymerase (Perler et al., 1992). Man kann deshalb davon ausgehen, dass auch bei der DNA-Polymerase von *N. equitans* erst die Verknüpfung der beiden Exteine zur Aktivität des Enzyms führt. Da alle bisher bei Archaeen gefundenen Inteine durchgehende Sequenzen aufweisen, kann man annehmen, dass sich auch das gespaltene Intein von *N. equitans* von einem ursprünglich ununterbrochenen Intein abgeleitet hat. Vermutlich wurde das Gen der DNA-Polymerase B durch eine Insertion oder durch eine Umordnung des Genoms innerhalb der Inteinsequenz gespalten.

N. equitans ist das erste obligat parasitische/ symbiontische hyperthermophile Archaeon, das bisher kultiviert wurde. Die Analyse seines Genoms spricht dafür, dass dieser Organismus sich bereits frühzeitig innerhalb der archaeellen Entwicklungslinie von einem wahrscheinlich freilebenden Organismus mit größerem Genom abgeleitet hat. Aufgrund seiner ungewöhnlichen 16S rRNA Sequenz ist *N. equitans* bei PCR-basierten Untersuchungen von Mikrobenpopulationen in Umweltproben lange Zeit unentdeckt geblieben. Um einen ersten Einblick in die natürliche Verbreitung von *N. equitans* und möglicher verwandter Organismen zu erhalten, wurden Sediment- und Wasserproben aus unterschiedlichen marinen und kontinentalen Hochtemperatur-Biotopen mit Hilfe modifizierter PCR-Primer untersucht. In der Probe eines vom Ostpazifischen Rücken stammenden Black Smoker Fragments konnte dabei nochmals die 16S rDNA Sequenz von *N. equitans* nachgewiesen werden. Außerdem wurden aus den Sedimentproben eines terrestrischen Heißwasser-Tümpels in der Caldera Uzon (Kamtschatka) sowie des Obsidian Pools (Yellowstone National Park, USA) zwei neuartige 16S rDNA Sequenzen amplifiziert, die als CU1 bzw. OP9 bezeichnet wurden. Beide Sequenzen weisen, wie auch die 16S rDNA Sequenz von *N. equitans*, Basenaustausche in nahezu allen als konserviert geltenden „Primer-Regionen“ auf. Überraschenderweise unterscheiden sich die Mutationen der neu entdeckten 16S rDNAs vielfach auch von denen in der 16S rDNA Sequenz von *N. equitans*. Phylogenetische Analysen zeigten, dass beide Sequenzen dennoch eindeutig dem Reich Nanoarchaeota zuzuordnen sind. Die CU1- und OP9-Sequenz weisen lediglich 83% Sequenzübereinstimmung mit der 16S rRNA von *N. equitans* auf, die zugehörigen Organismen sind demnach nur entfernt mit *N. equitans* verwandt. Lichtmikroskopische Untersuchungen und Ganzzellhybridisierungen mit fluoreszenzmarkierten Sonden, die anhand der CU1-Sequenz entwickelt wurden, weisen darauf hin, dass es sich bei diesen kontinentalen Vertretern der Nanoarchaeota ebenfalls um kleine Kokken handelt, die in engem Kontakt zu einer *Thermoproteus* Spezies leben. Eine parasitische oder symbiontische Lebensweise könnte möglicherweise ein weit verbreitetes

Merkmal innerhalb der Nanoarchaeota sein. Der Nachweis von Vertretern dieses Reiches in marinen Hydrothermalsystemen im Atlantik und im Pazifik sowie in kontinentalen heißen Quellen auf Kamtschatka und in den USA spricht für eine weite Verbreitung der Nanoarchaeota, die möglicherweise aufgrund ihrer parasitischen/ symbiontischen Lebensweise eine bedeutende ökologische Rolle in Hochtemperatur-Biotopen spielen. Dass die Vertreter dieser Organismengruppe in früheren Umweltanalysen übersehen wurden, weist auf eine bislang wenig beachtete Schwachstelle des rRNA-Konzepts hin: Die als „universell“ erachteten 16S rDNA spezifischen PCR-Primer wurden anhand von Sequenzinformationen aus kultivierten Mikroorganismen entwickelt. Diese machen jedoch wahrscheinlich weniger als ein Prozent der gesamten mikrobiellen Artenvielfalt aus (Ward et al., 1990; Amann et al., 1995). Es ist also nicht verwunderlich, dass Mikroorganismen mit abweichenden 16S rDNA Sequenzen existieren, die folglich nicht von den standardmäßig verwendeten Primern erfasst werden. Die Verwendung PCR-unabhängiger Nachweismethoden wie Southern Blot-Analysen sowie die Entwicklung neuartiger, innovativer Anreicherungs- und Kultivierungstechniken, wie z.B. beschrieben von Zengler et al. (2002), stellen Möglichkeiten zur Entdeckung solcher Organismen dar.

V. Zusammenfassung

Aus einer rekonstituierten Co-Kultur von *Ignicoccus* sp. KIN4/I mit anhaftenden kleinen Kokken wurde ein neuartiges archaeelles 16S rRNA Gen isoliert. Dieses weist Basenaustausche in nahezu allen als konserviert geltenden Sequenzbereichen auf und konnte deshalb in zuvor durchgeführten PCR-Analysen mit universellen und archaea-spezifischen Standardprimern nicht nachgewiesen werden. Durch *in situ* Hybridisierungen mit neu entwickelten fluoreszenzmarkierten Sonden wurden die kleinen an *Ignicoccus* sp. KIN4/I anhaftenden Kokken spezifisch gefärbt. Auf diese Weise wurde ein neuer Vertreter der Archaea identifiziert, dem der Name *Nanoarchaeum equitans* gegeben wurde. Phylogenetische Analysen von 16S rRNA und konkatenierten Aminosäuresequenzen ribosomaler Proteine zeigten, dass *N. equitans* einem bisher unbekanntem, als Nanoarchaeota bezeichneten vierten Reich der Archaea angehört, das im Stammbaum der Archaea sehr tief abzweigt.

Darauf wurden Primer für die spezifische Amplifikation der 16S rDNA von Vertretern der Nanoarchaeota entworfen. In Sedimentproben terrestrischer Heißwassertümpel im Yellowstone Nationalpark (USA) und in der Uzon Caldera (Kamtchatka) konnten damit zwei weitere Nanoarchaeota-verwandte 16S rRNA Sequenzen nachgewiesen werden. Durch Ganzzellhybridisierungen wurde die Morphologie der zugehörigen Organismen bestimmt.

Im Genom von *N. equitans* (sequenziert von der Firma Diversa) konnten durch Datenbankvergleiche mit bekannten archaeellen Genomen 552 für Proteine codierende Gene und 52 Gene stabiler RNAs identifiziert und deren Funktion annotiert werden. Durch die Auswertung der Genomdaten wurde belegt, dass es sich bei *N. equitans* um ein obligat parasitisches oder symbiontisches Archaeon mit einem reduzierten Genom handelt.

In den für die zwei Untereinheiten der DNA-Polymerase B codierenden Genen wurden die Teilsequenzen eines gespaltenen Mini-Inteins identifiziert. Durch Experimente mit rekombinanten DNA-Polymerase Untereinheiten konnte das Spleißen des Inteins *in vitro* gezeigt werden.

Die bei der Genomanalyse annotierte ATPase von *N. equitans* unterscheidet sich von den bisher bekannten A_1A_0 -Typ ATPasen durch die geringere Anzahl von Untereinheiten. In gereinigten Membranen von *N. equitans* konnte die Aktivität der ATPase nachgewiesen und näher charakterisiert werden.

VI. Anhang

Tab. 13: Annotierte Proteine von *N. equitans*

Für jede CDS wird die vorhergesagte Proteinfunktion aufgelistet. In Klammern ist der archaeele Vergleichsorganismus mit dem nächst ähnlichen homologen Protein angegeben.

Vergleichsorganismen innerhalb der Euryarchaeota:
Archaeoglobus fulgidus VC-16
Ferroplasma acidarmanus
Halobacterium sp. NRC-1
Methanocaldococcus jannaschii JAL-1
 "Methanococcus jannaschii"
Methanopyrus kandleri AV19
Methanosarcina acetivorans C2A
Methanothermobacter thermoautotrophicus. H
 "Methanobacterium thermoautotrophicum"
Pyrococcus abyssi GE5
Pyrococcus furiosus DSM 3638
Pyrococcus horikoshii OT3
Thermoplasma acidophilum
Thermoplasma volcanium GSS1
Vergleichsorganismen innerhalb der Crenarchaeota:
Aeropyrum permix K1
Pyrobaculum aerophilum IM2
Sulfolobus solfataricus
Sulfolobus tokodaii

Amino acid biosynthesis

Aromatic amino acid family

NEQ192 Prephenate dehydrogenase/ chorismate mutase/prephenate dehydratase [*A. fulgidus*]

Glutamate family

NEQ126 Glutamyl-tRNA^{Gln} amidotransferase, subunit D [*P. horikoshii*]
 NEQ245 Glutamyl-tRNA^{Gln} amidotransferase, subunit E [*S. tokodaii*] SPLIT, see NEQ396
 NEQ396 Glutamyl-tRNA^{Gln} amidotransferase, subunit E [*M. jannaschii*] SPLIT, see NEQ245
 NEQ185 Glutamyl-tRNA^{Gln}/aspartyl-tRNA^{Asn} amidotransferase, subunit B [*A. fulgidus*]
 NEQ360 Glutamyl-tRNA^{Gln}/aspartyl-tRNA^{Asn} amidotransferase, subunit A [*A. fulgidus*]
 NEQ513 Glutamyl-tRNA^{Gln}/aspartyl-tRNA^{Asn} amidotransferase, subunit C [*A. fulgidus*]

Coenzyme Biosynthesis

NEQ367 Nicotinamide mononucleotide adenyltransferase [*S. tokodaii*]

Cell envelope

Biosynthesis and degradation of surface polysaccharides and lipopolysaccharides

NEQ012 Glycosyltransferase [*M. acetivorans*]
 NEQ025 Mannose-1-phosphate guanylyltransferase [*A. fulgidus*]
 NEQ061 UDP-N-acetylglucosamine-dolichylphosphate-N-acetylglucosaminephosphotransferase [*S. solfataricus*]
 NEQ155 Oligosaccharyl transferase [*P. furiosus*]
 NEQ172 Glycosyltransferase [*P. horikoshii*]
 NEQ195 Glycosyltransferase [*S. tokodaii*]

Surface structures

NEQ300 Hypothetical surface layer protein [*M. jannaschii*]

Cellular processes

Cell division

NEQ119 Septum site-determining protein [*P. furiosus*]
 NEQ133 Cell division protein FtsZ [*P. horikoshii*]
 NEQ473 Cell division protein FtsZ [*A. fulgidus*]
 NEQ475 Cell division control protein (CDC48; AAA family ATPase) [*P. furiosus*]

Detoxification

NEQ011 Superoxide reductase [*P. horikoshii*]
 NEQ191 Thioredoxin peroxidase [*M. jannaschii*]

DNA metabolism

Chromosome-associated proteins

NEQ288 Histone protein [*M. jannaschii*]
 NEQ348 Histone protein [*M. jannaschii*]
 NEQ363 DNA-binding protein [*P. horikoshii*]
 NEQ538 Histone deacetylase/aminohydrolase [*P. aerophilum*]

DNA replication, recombination and repair

NEQ282 DNA replication initiation protein (MCM family) [*M. thermoautotrophicum*]
 NEQ057 Cell division control protein 6 related [*S. tokodaii*]
 NEQ003 ATP-dependent RNA helicase [*P. abyssi*]; SPLIT See NEQ409.
 NEQ409 ATP-dependent RNA helicase [*P. furiosus*]; SPLIT see NEQ003
 NEQ007 O⁶-Methylguanine DNA—protein-cysteine S-methyltransferase [*P. aerophilum*]
 NEQ045 DNA topoisomerase I [*P. horikoshii*]; SPLIT see NEQ324.
 NEQ324 DNA topoisomerase I [*P. horikoshii*]; SPLIT see NEQ045
 NEQ063 Ribonuclease HII [*P. aerophilum*]
 NEQ068 DNA-Directed DNA polymerase B [*P. furiosus*]; SPLIT see NEQ528.
 NEQ528 DNA-Directed DNA polymerase B [*P. furiosus*]; SPLIT see NEQ068
 NEQ077a Endonuclease IV [*P. abyssi*]
 NEQ088 Structure-specific flap endonuclease (FEN1) [*P. abyssi*]
 NEQ118 Single-stranded DNA-specific exonuclease, 5'-3' [*M. acetivorans*]
 NEQ126a Endonuclease III [*P. abyssi*]; SPLIT see NEQ398
 NEQ398 Endonuclease III [*A. fulgidus*]; SPLIT see NEQ126a
 NEQ144 DNA Topoisomerase VI, subunit B [*A. fulgidus*]
 NEQ542 DNA Topoisomerase VI, subunit A [*P. furiosus*]
 NEQ170 Replication factor C, small subunit [*A. fulgidus*]
 NEQ430 Replication factor C, large subunit [*M. jannaschii*]
 NEQ199 ssDNA Binding protein (RPA70/SSB family) [*M. jannaschii*]
 NEQ240 DNA-Directed DNA polymerase II, small subunit [*A. fulgidus*]
 NEQ420 DNA-Directed DNA polymerase II, large subunit [*P. furiosus*]
 NEQ256 DNA Double-strand break repair ATPase [*T. volcanium*]
 NEQ295 Sliding clamp protein for DNA replication (PCNA) [*P. abyssi*]
 NEQ536 Sliding clamp protein for DNA replication (PCNA) [*P. furiosus*]
 NEQ537 Sliding clamp protein for DNA replication (PCNA) [*P. abyssi*]
 NEQ318 Reverse gyrase [C-terminus] [*P. abyssi*]; SPLIT see NEQ434
 NEQ434 Reverse gyrase [N-terminus] [*P. horikoshii*]; SPLIT see NEQ318
 NEQ341 DNA primase/topoisomerase [*P. furiosus*]
 NEQ395 DNA Primase [*T. acidophilum*]
 NEQ346a Endonuclease V [*F. acidarmanus*]
 NEQ368 DNA-(Apurinic or apyrimidinic site) lyase (endonuclease IV) [*M. jannaschii*]

NEQ369 Helicase-related DNA repair protein (RAD25/XPB subfamily) [*S. solfataricus*]
 NEQ372 Uracil DNA glycolase [*S. tokodaii*]
 NEQ383 DNA repair protein (Rad32/Mre11) [*P. horikoshii*]

NEQ424 Holliday-junction resolvase [*M. thermoautotrophicum*]
 NEQ426 DNA Recombinase (RadA) [*P. furiosus*]
 NEQ509 DNA Ligase; ATP-dependent [*P. abyssi*]
 NEQ387 DNA Helicase/structure-specific endonuclease [*P. abyssi*]

Energy metabolism

ATP-proton motive force interconversion

NEQ103 A₁A₀ ATP synthase, subunit A [*M. kandleri*]
 NEQ263 A₁A₀ ATP synthase, subunit B [*M. jannaschii*]
 NEQ166 A₁A₀ ATP synthase, subunit D [*P. horikoshii*]
 NEQ217 A₁A₀ ATP synthase, proteolipid subunit K [*M. jannaschii*]
 NEQ410 A₁A₀ ATP synthase, subunit I [*P. furiosus*]

Amino acids and amines

NEQ077 Glutamate dehydrogenase [*T. volcanium*]
 NEQ190 Branched-chain amino acid aminotransferase [*P. aerophilum*]
 NEQ223 Agmatinase/arginase [*M. jannaschii*]

Electron transport

NEQ024 Hypothetical flavoprotein [*P. aerophilum*]
 NEQ049 Hypothetical [Fe-S] protein [*A. fulgidus*]
 NEQ051 Ferredoxin—NADP reductase [*P. furiosus*]
 NEQ084 IMP Dehydrogenase-related protein [*A. fulgidus*]
 NEQ306 Hypothetical NAD(P)-dependent oxidoreductase [*S. tokodaii*]
 NEQ321 Thioredoxin [*P. furiosus*]
 NEQ373 Ferredoxin protein [*P. horikoshii*]
 NEQ382 Hypothetical oxidoreductase (contains Fe-S cluster) [*P. furiosus*]
 NEQ491 Thioredoxin reductase [*S. solfataricus*]

Other

NEQ461 Inorganic pyrophosphatase [*S. tokodaii*]

Hypothetical Proteins

NEQ006 Hypothetical protein
 NEQ010 Hypothetical protein
 NEQ018 Hypothetical protein
 NEQ020 Hypothetical protein
 NEQ026 Hypothetical protein
 NEQ027 Hypothetical protein
 NEQ028 Hypothetical protein
 NEQ029 Hypothetical protein
 NEQ032 Hypothetical protein
 NEQ033 Hypothetical protein
 NEQ034 Hypothetical protein
 NEQ035 Hypothetical protein
 NEQ036 Hypothetical protein
 NEQ040 Hypothetical protein
 NEQ041 Hypothetical protein
 NEQ046 Hypothetical protein
 NEQ048 Hypothetical protein
 NEQ050 Hypothetical protein
 NEQ056 Hypothetical protein
 NEQ060 Hypothetical protein
 NEQ062 Hypothetical membrane protein
 NEQ066 Hypothetical protein
 NEQ070 Hypothetical protein
 NEQ072 Hypothetical protein
 NEQ079 Hypothetical protein
 NEQ080 Hypothetical protein
 NEQ081 Hypothetical protein
 NEQ085 Hypothetical protein
 NEQ086 Hypothetical protein
 NEQ089 Hypothetical protein
 NEQ094 Hypothetical protein
 NEQ095 Hypothetical protein

NEQ099 Hypothetical protein
 NEQ100 Hypothetical protein
 NEQ104 Hypothetical protein
 NEQ107 Hypothetical protein
 NEQ116 Hypothetical protein
 NEQ120 Hypothetical protein
 NEQ121 Hypothetical protein
 NEQ123 Hypothetical protein
 NEQ132 Hypothetical protein
 NEQ134 Hypothetical protein
 NEQ135 Hypothetical protein
 NEQ136 Hypothetical protein
 NEQ137 Hypothetical protein
 NEQ138 Hypothetical protein
 NEQ139 Hypothetical protein
 NEQ140 Hypothetical protein
 NEQ145 Hypothetical protein
 NEQ151 Hypothetical protein
 NEQ153 Hypothetical protein
 NEQ154 Hypothetical protein
 NEQ160 Hypothetical protein
 NEQ161 Hypothetical protein
 NEQ163 Hypothetical protein
 NEQ164 Hypothetical membrane protein
 NEQ171 Hypothetical protein
 NEQ188 Hypothetical protein
 NEQ193 Hypothetical protein
 NEQ194 Hypothetical protein
 NEQ196 Hypothetical protein
 NEQ197 Hypothetical protein
 NEQ200 Hypothetical protein
 NEQ209 Hypothetical protein
 NEQ214 Hypothetical protein
 NEQ215 Hypothetical protein
 NEQ216 Hypothetical protein
 NEQ218 Hypothetical protein
 NEQ221 Hypothetical protein
 NEQ222 Hypothetical protein
 NEQ224 Hypothetical protein
 NEQ225 Hypothetical protein
 NEQ232 Hypothetical membrane protein
 NEQ233 Hypothetical protein
 NEQ236 Hypothetical protein
 NEQ237 Hypothetical membrane protein
 NEQ243 Hypothetical protein
 NEQ246 Hypothetical protein
 NEQ249 Hypothetical protein
 NEQ250 Hypothetical protein
 NEQ253 Hypothetical protein
 NEQ254 Hypothetical protein
 NEQ255 Hypothetical protein
 NEQ259 Hypothetical protein
 NEQ260 Hypothetical protein
 NEQ265 Hypothetical protein
 NEQ266 Hypothetical protein
 NEQ271 Hypothetical protein
 NEQ273 Hypothetical protein
 NEQ275 Hypothetical protein
 NEQ278 Hypothetical protein
 NEQ279 Hypothetical protein
 NEQ280 Hypothetical protein
 NEQ284 Hypothetical protein
 NEQ289 Hypothetical protein
 NEQ290 Hypothetical protein
 NEQ291 Hypothetical protein
 NEQ292 Hypothetical protein
 NEQ296 Hypothetical protein
 NEQ301 Hypothetical protein
 NEQ304 Hypothetical protein
 NEQ309 Hypothetical protein
 NEQ312 Hypothetical protein
 NEQ322 Hypothetical protein
 NEQ327 Hypothetical protein
 NEQ330 Hypothetical protein
 NEQ331 Hypothetical protein
 NEQ332 Hypothetical protein
 NEQ335 Hypothetical protein
 NEQ336 Hypothetical protein
 NEQ354 Hypothetical protein
 NEQ356 Hypothetical membrane protein
 NEQ357 Hypothetical protein
 NEQ362 Hypothetical protein
 NEQ365 Hypothetical protein
 NEQ376 Hypothetical protein
 NEQ380 Hypothetical protein
 NEQ391 Hypothetical protein
 NEQ392 Hypothetical protein
 NEQ403 Hypothetical protein
 NEQ404 Hypothetical protein
 NEQ407 Hypothetical protein
 NEQ408 Hypothetical protein
 NEQ413 Hypothetical protein
 NEQ416 Hypothetical protein
 NEQ418 Hypothetical protein
 NEQ442 Hypothetical protein
 NEQ443 Hypothetical protein
 NEQ444 Hypothetical protein
 NEQ445 Hypothetical protein
 NEQ447 Hypothetical protein
 NEQ448 Hypothetical protein
 NEQ458 Hypothetical protein
 NEQ462 Hypothetical protein
 NEQ468 Hypothetical protein

NEQ470 Hypothetical protein
 NEQ471 Hypothetical protein
 NEQ474 Hypothetical protein
 NEQ476 Hypothetical protein
 NEQ477 Hypothetical protein
 NEQ483 Hypothetical protein
 NEQ484 Hypothetical protein
 NEQ485 Hypothetical protein
 NEQ492 Hypothetical protein
 NEQ497 Hypothetical protein
 NEQ499 Hypothetical protein
 NEQ500 Hypothetical protein
 NEQ504 Hypothetical protein
 NEQ510 Hypothetical protein
 NEQ514 Hypothetical protein
 NEQ518 Hypothetical protein
 NEQ520 Hypothetical protein
 NEQ529 Hypothetical protein
 NEQ532 Hypothetical protein
 NEQ533 Hypothetical protein
 NEQ539 Hypothetical protein
 NEQ545 Hypothetical protein
 NEQ549 Hypothetical protein
 NEQ550 Hypothetical protein

Hypothetical proteins - Conserved

NEQ001 Hypothetical protein [*M. jannaschii*]
 NEQ004 Hypothetical protein [*M. jannaschii*]
 NEQ005 Hypothetical protein [*S. tokodaii*]
 NEQ009 Hypothetical protein [*P. aerophilum*]
 NEQ016 Hypothetical protein [*P. horikoshii*]
 NEQ017 Hypothetical protein [*P. horikoshii*]
 NEQ019 Hypothetical protein [*P. horikoshii*]
 NEQ021 Hypothetical protein [*M. jannaschii*]
 NEQ030 Hypothetical protein [*M. acetivorans*]
 NEQ043 Hypothetical protein [*A. pernix*]
 NEQ054 Hypothetical protein [*P. abyssii*]
 NEQ071 Hypothetical protein [*A. fulgidus*]
 NEQ078 Hypothetical protein [*A. pernix*]
 NEQ098 Hypothetical protein [*P. furiosus*]
 NEQ109 Hypothetical protein [*A. fulgidus*]
 NEQ113 Hypothetical protein [*S. solfataricus*]
 NEQ114 Hypothetical protein [*A. fulgidus*]
 NEQ128 Hypothetical protein [*S. solfataricus*]
 NEQ131 Hypothetical protein [*P. aerophilum*]
 NEQ147 Hypothetical protein [*A. fulgidus*]
 NEQ150 Hypothetical protein [*M. thermoautotrophicum*]
 NEQ158 Hypothetical protein [*P. furiosus*]
 NEQ162 Hypothetical membrane protein [*M. jannaschii*]
 NEQ189 Hypothetical membrane protein [*Halobacterium* sp.]
 NEQ212 Hypothetical protein [*P. furiosus*]
 NEQ244 Hypothetical protein [*T. acidophilum*]
 NEQ258 Hypothetical protein [*A. fulgidus*]
 NEQ267 Hypothetical protein [*M. jannaschii*]
 SPLIT see NEQ268
 NEQ268 Hypothetical protein [*M. jannaschii*]
 SPLIT see NEQ267
 NEQ277 Hypothetical protein [*Halobacterium* sp.]
 NEQ283 Hypothetical protein [*A. fulgidus*]
 NEQ285 Hypothetical protein [*M. acetivorans*]
 NEQ288a Hypothetical protein [*P. horikoshii*]
 NEQ298 Hypothetical protein [*P. horikoshii*]
 NEQ310 Hypothetical protein [*P. abyssii*]
 NEQ313 Hypothetical protein [*M. acetivorans*]
 NEQ314 Hypothetical protein [*A. fulgidus*]
 NEQ325 Hypothetical protein [*P. furiosus*]
 NEQ334 Hypothetical protein [*P. furiosus*]
 NEQ339 Hypothetical membrane protein [*T. volcanium*]
 NEQ347 Hypothetical protein [*M. acetivorans*]
 NEQ350 Hypothetical protein [*T. volcanium*]
 NEQ351 Hypothetical protein [*P. furiosus*]
 NEQ352 Hypothetical membrane protein [*P. furiosus*]
 NEQ353 Hypothetical protein [*A. fulgidus*]
 NEQ371 Hypothetical protein [*S. tokodaii*]
 NEQ386 Hypothetical protein [*P. abyssii*]
 NEQ389a Hypothetical basic protein [*M. jannaschii*]
 NEQ415 Hypothetical protein [*S. tokodaii*]
 NEQ419 Hypothetical protein [*P. horikoshii*]
 NEQ428 Hypothetical protein [*M. jannaschii*]
 NEQ429 Hypothetical protein [*S. tokodaii*]
 NEQ431 Hypothetical protein [*P. furiosus*]
 NEQ435 Hypothetical protein [*A. fulgidus*]
 NEQ441 Hypothetical protein [*M. kandleri*]
 NEQ449 Hypothetical protein [*S. tokodaii*]
 NEQ455 Hypothetical membrane protein [*P. abyssii*]
 NEQ490 Hypothetical protein [*M. acetivorans*]
 NEQ515 Hypothetical protein [*P. horikoshii*]
 NEQ524 Hypothetical protein [*P. abyssii*]
 NEQ526 Hypothetical protein [*T. volcanium*]

Protein fate

Degradation of proteins, peptides, and glycopeptides

NEQ023 Hypothetical Zn-dependent peptidase [*P. aerophilum*]
 NEQ042 Carboxypeptidase (M32 family) [*P. aerophilum*]
 NEQ044 O-Sialoglycoprotein endopeptidase [N-terminus]/tyrosine protein kinase [C-terminus] [*P. furiosus*]
 NEQ110 Serine protease [*A. fulgidus*]
 NEQ186 Proteasome-activating nucleotidase [*S. solfataricus*]
 NEQ203 Proteasome, β -subunit [*M. jannaschii*]
 NEQ521 Proteasome, α -subunit [*M. kandleri*]
 NEQ281 ATP-Dependent protease LA related protein [*P. furiosus*]
 NEQ315 Serine protease IV (ClpP class) [*M. jannaschii*]
 NEQ343 Intracellular protease [*P. abyssii*]
 NEQ349 ATP-Dependent protease La [*A. fulgidus*]
 NEQ412 Leucine aminopeptidase [*A. pernix*]
 NEQ414 ATP-Dependent protease La [*M. jannaschii*]
 NEQ451 Zn-Dependent protease [*P. horikoshii*]
 NEQ493 Glycoprotein endopeptidase [*P. horikoshii*]
 NEQ511 Amidase [*P. horikoshii*]
 NEQ544 Hypothetical membrane-associated Zn-dependent protease [*M. kandleri*]

Protein and peptide secretion and trafficking

NEQ168 Protein translocase, SecY/SEC61 α subunit [*M. kandleri*]
 NEQ375a Protein translocase, SecE/SEC61 γ subunit [*A. pernix*]
 NEQ436 Protein translocase, SecD subunit [*M. jannaschii*]
 NEQ437 Protein translocase, SecF subunit [*M. jannaschii*]
 NEQ169 Type II secretion system protein [*A. fulgidus*]
 NEQ425 Type IV secretion system protein [*M. acetivorans*]
 NEQ432 Type I signal peptidase [*M. kandleri*]

Protein folding and stabilization

NEQ141 Thermosome (type II chaperonin) [*P. horikoshii*]
 NEQ344 Small heat shock protein (class I) [*M. acetivorans*]
 NEQ385 GimC Chaperonin, subunit α [*P. furiosus*]
 NEQ516 GimC Chaperonin, subunit β [*M. jannaschii*]

Protein modification and repair

NEQ002 Peptidyl-prolyl *cis-trans* isomerase [*M. jannaschii*]
 NEQ047 Protein adenylyltransferase [*A. pernix*]
 NEQ226 Hypothetical diphthamide synthesis protein [*F. acidarmanus*]
 NEQ399 Methionine aminopeptidase [*P. abyssii*]
 NEQ402 Deoxyhypusine synthase [*T. acidophilum*]
 NEQ422 Diphthine synthase [*P. furiosus*]
 NEQ459 Protein disulfide oxidoreductase [*P. furiosus*]

Protein synthesis

Ribosomal proteins: synthesis and modification

NEQ508 SSU Ribosomal protein S2 [*P. horikoshii*]
 NEQ481 SSU Ribosomal protein S3P [*M. jannaschii*]
 NEQ375 SSU Ribosomal protein S3AE [*M. kandleri*]
 NEQ478 SSU Ribosomal protein S4E [*M. thermoautotrophicum*]
 NEQ247 SSU Ribosomal protein S4P [*P. horikoshii*]
 NEQ388 SSU Ribosomal protein S5 [*P. aerophilum*]
 NEQ105 SSU Ribosomal protein S6E [*M. kandleri*]
 NEQ319 Hypothetical SSU ribosomal protein HS6 [*S. tokodaii*]
 NEQ242 SSU Ribosomal protein S7 [*M. kandleri*]
 NEQ469 SSU Ribosomal protein S8E [*A. fulgidus*]
 NEQ274 SSU Ribosomal protein S8P [*P. furiosus*]
 NEQ446 SSU Ribosomal protein S9 [*P. furiosus*]
 NEQ083 SSU Ribosomal protein S10AB [*S. solfataricus*]
 NEQ069 SSU Ribosomal protein S11 [*M. kandleri*]
 NEQ058 SSU ribosomal protein S12P [*P. furiosus*]
 NEQ467 SSU Ribosomal protein S13P [*M. kandleri*]
 NEQ227 SSU Ribosomal protein S14 [*S. solfataricus*]

NEQ487 SSU Ribosomal protein S15P/S13E [*M. kandleri*]
 NEQ326 SSU Ribosomal protein S17P [*P. horikoshii*]
 NEQ320 SSU Ribosomal protein S17E [*P. horikoshii*]
 NEQ480 SSU Ribosomal protein S19P [*P. abyssi*]
 NEQ187 SSU Ribosomal protein S19E [*P. furiosus*]
 NEQ548 SSU Ribosomal protein S24E [*M. jannaschii*]
 NEQ219 SSU Ribosomal protein S27E [*M. kandleri*]
 NEQ176 SSU Ribosomal protein S27AE [*P. furiosus*]
 NEQ359 SSU Ribosomal protein S28E [*P. horikoshii*]
 NEQ546 LSU Ribosomal protein L1P [*P. abyssi*]
 NEQ361 LSU Ribosomal protein L2P [*P. abyssi*]
 NEQ433 LSU Ribosomal protein L3P [*M. thermoautotrophicum*]
 NEQ146 LSU Ribosomal protein L4 [*M. kandleri*]
 NEQ093 LSU Ribosomal protein L5P [*P. abyssi*]
 NEQ241 LSU Ribosomal protein L6P [*P. abyssi*]
 NEQ091 LSU Ribosomal protein L10E [*M. jannaschii*]
 NEQ101 LSU Ribosomal protein L11 [*M. kandleri*]
 NEQ201 LSU Ribosomal protein L12A [*P. abyssi*]
 NEQ207 LSU Ribosomal protein L13 [*M. kandleri*]
 NEQ178 LSU Ribosomal protein L14E [*M. jannaschii*]
 NEQ092 LSU Ribosomal protein L14P [*M. jannaschii*]
 NEQ317 LSU Ribosomal protein L15 [*P. aerophilum*]
 NEQ181 LSU Ribosomal protein L15E [*P. furiosus*]
 NEQ450 LSU Ribosomal protein L16P/L10E [*A. fulgidus*]
 NEQ075 LSU Ribosomal protein L18P [*M. jannaschii*]
 NEQ489 LSU Ribosomal protein L18E [*S. solfataricus*]
 NEQ379 LSU ribosomal protein L19E [*M. jannaschii*]
 NEQ346 LSU Ribosomal protein LXA [*P. horikoshii*]
 NEQ397 LSU Ribosomal protein L21E [*P. furiosus*]
 NEQ204 LSU Ribosomal protein L22 [*M. kandleri*]
 NEQ065 LSU Ribosomal protein L23 [*S. tokodaii*]
 NEQ257 LSU Ribosomal protein L24P [*P. abyssi*]
 NEQ337a LSU Ribosomal protein L24E [*A. fulgidus*]
 NEQ262 LSU Ribosomal protein L29 [*M. jannaschii*]
 NEQ179 LSU Ribosomal protein L30E [*M. jannaschii*]
 NEQ311 LSU Ribosomal protein L30P [*M. jannaschii*]
 NEQ364 LSU Ribosomal protein L31E [*M. jannaschii*]
 NEQ530 LSU Ribosomal protein L32E [*P. abyssi*]
 NEQ297 LSU Ribosomal protein L34E [*M. jannaschii*]
 NEQ303 LSU Ribosomal protein L35AE [*P. abyssi*]
 NEQ038 LSU Ribosomal protein L37AE/L43A [*M. kandleri*]
 NEQ006a LSU Ribosomal protein L37E [*P. horikoshii*]
 NEQ427a LSU Ribosomal protein L39E [*P. abyssi*]
 NEQ505a LSU Ribosomal protein L40E [*P. furiosus*]
 NEQ183 LSU Ribosomal protein L44E; [*T. acidophilum*]

Translation factors

NEQ235 Hypothetical ribosome assembly protein [*M. thermoautotrophicum*]
 NEQ264 Translation initiation factor (SUI1 family) [*P. furiosus*]
 NEQ130 Translation initiation factor aIF-1A [*P. furiosus*]
 NEQ405 Translation initiation factor aIF2- α [*M. kandleri*]
 NEQ323 Translation initiation factor aIF-2 β [*P. horikoshii*]
 NEQ270 Translation initiation factor aIF-2 γ [*P. abyssi*]
 NEQ498 Translation initiation factor 2 related protein [*M. kandleri*]
 NEQ393 Translation initiation factor aIF-5A [*P. furiosus*]
 NEQ517 Translation initiation factor aIF-6 [*S. tokodaii*]
 NEQ082 Translation elongation factor EF-1 α [*P. furiosus*]
 NEQ220 Translation elongation factor EF-1 β [*M. kandleri*]
 NEQ543 Elongation factor 2 (aEF-2) [*P. furiosus*]
 NEQ052 Peptide chain release factor aRF, subunit 1 [*P. abyssi*]

tRNA aminoacylation

NEQ547 Alanyl-tRNA synthetase [*M. acetivorans*]

SPLIT see NEQ211
 NEQ211 Alanyl-tRNA synthetase [C-terminus] [*P. abyssi*] SPLIT see NEQ547
 NEQ208 Arginyl-tRNA synthetase (class 1) [*M. jannaschii*]
 NEQ535 Aspartyl-tRNA synthetase (class 2) [*A. pernix*]
 NEQ055 Cysteinyl-tRNA synthetase [*P. furiosus*]
 NEQ302 Glutamyl-tRNA synthetase (class 1) [*P. abyssi*]
 NEQ417 Glycyl-tRNA synthetase (class 2) [*P. abyssi*]
 NEQ102 Histidyl-tRNA synthetase (class 2) [*A. pernix*]
 NEQ230 Isoleucyl-tRNA synthetase (class 1a) [*P. furiosus*]
 NEQ239 Leucyl-tRNA synthetase (class 1a) [*M. jannaschii*]
 NEQ087 Lysyl-tRNA synthetase (class-1) [*Halobacterium* sp.]
 NEQ457 Methionyl-tRNA synthetase (class 1a) [*P. horikoshii*]
 NEQ505 Phenylalanyl-tRNA synthetase, α -subunit [*S. solfataricus*]
 NEQ479 Phenylalanyl-tRNA synthetase, β -chain [*P. furiosus*]
 NEQ210 Prolyl-tRNA synthetase (class 2) [*M. kandleri*]
 NEQ308 Seryl-tRNA synthetase (class 2) [*S. tokodaii*]
 NEQ177 Threonyl-tRNA synthetase (class 2) [*P. aerophilum*]
 NEQ115 Tryptophanyl-tRNA synthetase (class 1b) [*S. solfataricus*]
 NEQ389 Tyrosyl-tRNA synthetase (class 1b) [*P. furiosus*]
 NEQ252 Valyl-tRNA synthetase (class 1a) [*A. pernix*]

tRNA and rRNA modification and processing

NEQ008 2-Methylthioadenosine synthase [*S. tokodaii*]
 NEQ037 Small nuclear ribonucleoprotein (snRNP) [*M. kandleri*]
 NEQ053 rRNA Methyltransferase [*P. abyssi*]
 NEQ108 rRNA(Guanine-26, N_2 - N_2) methyltransferase [*S. tokodaii*]
 NEQ111 Ribonuclease PH [*A. fulgidus*]
 NEQ124 tRNA-Guanine transglycosylase [*P. furiosus*] SPLIT see NEQ305
 NEQ305 tRNA-Guanine transglycosylase [*M. acetivorans*] SPLIT See NEQ124
 NEQ125 Box C/D snoRNP RNA modification enzyme, fibrillar subunit [*P. furiosus*]
 NEQ342 Box C/D snoRNP RNA modification enzyme, Nop5p subunit [*S. tokodaii*]
 NEQ152 tRNA Nucleotidyltransferase (CCAadding enzyme) [*S. tokodaii*]
 NEQ165 LSU Ribosomal protein L11P methyltransferase [*P. furiosus*]
 NEQ205 tRNA Intron endonuclease [*M. jannaschii*]
 NEQ261 tRNA Intron endonuclease [*M. acetivorans*]
 NEQ502 2'-5' RNA Ligase [*M. jannaschii*]
 NEQ228 tRNA Methyltransferase [*P. furiosus*]
 NEQ238 *N*-Adenine rRNA methyltransferase [*M. jannaschii*]
 NEQ248 Ribonuclease PH-related protein [*P. furiosus*]
 NEQ293 tRNA Pseudouridine synthase [*P. abyssi*]
 NEQ333 tRNA Pseudouridine synthase [*M. jannaschii*]
 NEQ337 tRNA 1-Methyladenosine methyltransferase [*M. jannaschii*]
 NEQ384 rRNA Methyltransferase [*S. solfataricus*]
 NEQ423 Thiamin biosynthesis/4-thiouridine synthesis protein [*A. fulgidus*]
 NEQ440 tRNA Methyltransferase [*M. thermoautotrophicum*]
 NEQ454 tRNA Pseudouridine synthase [*P. furiosus*]
 NEQ522 tRNA Methyltransferase [*M. jannaschii*]

Purines, pyrimidines, nucleosides, and nucleotides

2'-Deoxyribonucleotide metabolism

NEQ316 dCTP deaminase/dUTP diphosphatase [*M. thermoautotrophicum*]
 NEQ329 dUTP diphosphatase [*M. acetivorans*]

Nucleotide and nucleoside interconversions

NEQ015 Thymidylate synthase; flavindependent [*S. tokodaii*]

NEQ149 Adenylate kinase [*S. tokodaii*]
 NEQ307 Nucleoside diphosphate kinase [*P. aerophilum*]
 NEQ345 Anaerobic ribonucleosidetriphosphate reductase [*P. abyssi*]

Signal transduction

NEQ460 Serine/threonine protein kinase [*M. kandleri*]
 NEQ464 Serine/threonine protein kinase with N-terminal DNA-binding HTH domain [*M. kandleri*]

Transcription

DNA-dependent RNA polymerase

NEQ503 DNA-Directed RNA polymerase, subunit A [*P. furiosus*]
 NEQ427 DNA-Directed RNA polymerase, subunit A' [*P. abyssi*]
 NEQ156 DNA-Directed RNA polymerase, subunit B' [*P. abyssi*]
 NEQ173 DNA-Directed RNA polymerase, subunit B'' [*P. horikoshii*]
 NEQ452 DNA-Directed RNA polymerase, subunit D [*P. abyssi*]
 NEQ370 DNA-Directed RNA polymerase, subunit E' [*M. jannaschii*]
 NEQ231 DNA-Directed RNA polymerase, subunit E'' [*P. aerophilum*]
 NEQ411 DNA-Directed RNA polymerase, subunit F [*M. jannaschii*]
 NEQ507 DNA-Directed RNA polymerase, subunit H [*M. jannaschii*]
 NEQ205a DNA-Directed RNA polymerase, subunit K [*P. horikoshii*]
 NEQ182 DNA-Directed RNA polymerase, subunit L [*S. tokodaii*]
 NEQ377 DNA-Directed RNA polymerase, subunit M [*S. tokodaii*]
 NEQ338 DNA-Directed RNA polymerase, subunit N [*A. pernix*]
 NEQ399a DNA-Directed RNA polymerase, subunit P [*P. furiosus*]

Degradation of DNA or RNA

NEQ064 Binuclear zinc phosphodiesterase [*M. jannaschii*]
 NEQ097 Thernonuclease [*M. thermoautotrophicum*]

Transcription factors

NEQ039 Transcription initiation TATAbinding protein (TBP) [*M. jannaschii*]
 NEQ276 Transcription initiation factor IIB [*P. abyssi*]
 NEQ482 Transcription initiation protein E (TFE) [*M. thermoautotrophicum*]
 NEQ073a Hypothetical zinc-finger protein [*P. aerophilum*]
 NEQ078a Hypothetical helix-turn-helix transcriptional regulator [*A. fulgidus*]
 NEQ541 Transcriptional regulator [*S. tokodaii*]
 NEQ229 Transcriptional regulator (AsnC family) [*M. jannaschii*]
 NEQ328 Transcriptional regulator (AsnC family) [*P. furiosus*]
 NEQ453 Transcriptional regulator (V4R and HTH domains) [*M. kandleri*]
 NEQ534 Transcriptional regulator [*P. horikoshii*]
 NEQ022 ATP-dependent RNA helicase [*P. horikoshii*]
 NEQ540 Transcription elongation factor (SPT5/NusG family) [*P. furiosus*]
 NEQ180 Transcription termination/termination factor [*M. acetivorans*]
 NEQ076 Hypothetical mRNA 3'-end processing factor [*P. furiosus*]
 NEQ143 Multiprotein bridging factor [*S. tokodaii*]

Transport and binding proteins

NEQ014 TDT (tellurite/dicarboxylate) family transporter [*P. abyssi*]
 NEQ073 ABC transporter, substrate-binding subunit
 NEQ074 ABC transporter, ATP-binding subunit [*P. furiosus*]
 NEQ090 Polysaccharide transporter [*A. fulgidus*]
 NEQ129 ABC transporter, permease subunit [*A. fulgidus*]
 NEQ175 glutamine ABC transporter, permease subunit [*M. jannaschii*]
 NEQ198 Mechanosensitive ion channel membrane protein [*M. jannaschii*]
 NEQ299 ABC transporter, ATP-binding subunit; contains [4Fe-4S] cluster [*P. horikoshii*]

- NEQ421 ABC transporter, ATP-binding subunit [*M. acetivorans*]
 NEQ486 Na⁺/Ca²⁺- antiporter (CaCA family) [*P. abyssi*]
 NEQ501 Metal ion transporter (MIT-family) [*P. horikoshii*]
 NEQ531 Mechanosensitive ion channel membrane protein [*M. jannaschii*]

Unknown function

- NEQ013 Hypothetical "radical SAM" protein [*S. tokodaii*]
 NEQ031 RNA-binding protein [*S. tokodaii*]
 NEQ059 Hypothetical NTP-binding protein [*P. abyssi*]
 NEQ067 Hypothetical member of metallo- β -lactamase superfamily [*P. abyssi*]
 NEQ096 Hypothetical NTP-binding protein [*M. kandleri*] SPLIT see NEQ495
 NEQ495 Hypothetical NTP-binding protein [*P. horikoshii*] SPLIT see NEQ096
 NEQ112 Hypothetical GTPase (OBG/HflX superfamily) [*P. furiosus*]
 NEQ117 Hypothetical NTP-binding protein [*M. jannaschii*]
 NEQ122 Hypothetical member of metallo- β -lactamase superfamily [*P. furiosus*]
 NEQ127 Hypothetical O-carbamoyltransferase [*M. jannaschii*]
 NEQ148 Hypothetical "radical SAM" protein [*P. horikoshii*]
 NEQ157 Hypothetical GTPase (OBG/HflX superfamily) [*P. horikoshii*]
 NEQ159 Phosphatidylethanolamine-binding protein [*S. solfataricus*]
 NEQ174 Hypothetical GTP-binding protein [*P. horikoshii*]
 NEQ184 Hypothetical RNA-binding protein (contain S1 domain and KH domain) [*A. fulgidus*]
 NEQ198a Phosphoadenosine phosphosulfate reductase related protein [C-terminal domain] [*P. furiosus*]
 NEQ206 Hypothetical protein with RNA-binding PUA domain [*P. aerophilum*]
 NEQ213 Histidine triad family protein [*M. acetivorans*]
 NEQ234 Magnesium chelatase, ChII subunit [*P. furiosus*]
 NEQ284a Hypothetical Zn-ribbon protein [*M. jannaschii*]
 NEQ294 Hypothetical ATP-binding protein [*P. horikoshii*]
 NEQ340 Hypothetical protein (HAD superfamily) [*T. volcanium*]
 NEQ355 Hypothetical Zn-ribbon protein [*A. fulgidus*]
 NEQ358 Hypothetical phosphoesterase protein [*P. abyssi*]
 NEQ366 Hypothetical GTP-binding protein [*P. horikoshii*]
 NEQ378 Hypothetical member of metallo- β -lactamase superfamily [*P. abyssi*]
 NEQ381 Hypothetical "radical SAM" protein [*P. abyssi*]
 NEQ401 ATP-binding protein (AAA+ class) [*M. kandleri*]
 NEQ406 Hypothetical nucleotide-binding
 NEQ432a Hypothetical Zn-ribbon protein [*P. horikoshii*]
 NEQ438 Hypothetical RNA-binding protein [*P. abyssi*] SPLIT see NEQ506
 NEQ506 Hypothetical RNA-binding protein [*S. solfataricus*] SPLIT see NEQ438
 NEQ456 Divalent metal cation-dependent hydrolase (TatD family) [*S. solfataricus*]
 NEQ463 Hypothetical GTPase [*S. solfataricus*]
 NEQ466 Hypothetical member of metallo- β -lactamase superfamily [*M. jannaschii*]
 NEQ472 Hypothetical phosphoesterase [*M. thermoautotrophicum*]
 NEQ489a Hypothetical Zn-ribbon protein [*M. acetivorans*]
 NEQ494 Hypothetical "radical SAM protein" [*S. tokodaii*]
 NEQ512 Hypothetical ATP-binding protein [*M. acetivorans*]
 NEQ519 Hypothetical zinc-binding nucleotidyl β -phosphatase (HIT family) [*M. jannaschii*]
 NEQ523 Hypothetical ATP diphosphatase (PPloop family) [*P. horikoshii*]
 NEQ525 Phosphoadenosine phosphosulfate reductase related protein [*P. furiosus*]
 NEQ527 Hypothetical NTP-binding protein [*S. tokodaii*]

VII. Literaturverzeichnis

Adams, M. D., Celniker, S. E., Holt, R. A., Evans, C. A., Gocayne, J. D., Amanatides, P. G., Scherer, S. E., Li, P. W., Hoskins, R. A., Galle, R. F., George, R. A., Lewis, S. E., Richards, S., Ashburner, M., Henderson, S. N., Sutton, G. G., Wortman, J. R., Yandell, M. D., Zhang, Q., Chen, L. X., Brandon, R. C., Rogers, Y. H., Blazej, R. G., Champe, M., Pfeiffer, B. D., et al. (2000) The genome sequence of *Drosophila melanogaster*. *Science* **287**:2185-2195.

Akman, L., Yamashita, A., Watanabe, H., Oshima, K., Shiba, T., Hattori, M., und Aksoy, S. (2002) Genome sequence of the endocellular obligate symbiont of tsetse flies, *Wigglesworthia glossinidia*. *Nat.Genet.* **32**:402-407.

Allen, M. B. (1959) Studies with *Cyanidium caldarium*, an anomalously pigmented chlorophyte. *Arch.Microbiol.* **32**:270-277.

Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W., und Lipman, D. J. (1990) Basic local alignment search tool. *J.Mol.Biol.* **215**:403-410.

Amann, G. (2000) Die Ganzzellhybridisierung und ihre Problematik am Beispiel der *Korarchaeota*. Dissertation am Lehrstuhl für Mikrobiologie der Universität Regensburg

Amann, R. I., Glöckner, F.-O., und Neef, A. (1997) Modern methods in subsurface microbiology: in situ identification of microorganisms with nucleic acid probes. *FEMS Microbiol.Rev.* **20**:191-200.

Amann, R. I., Krumholz, L., und Stahl, D. A. (1990) Fluorescent-oligonucleotide probing of whole cells for determinative, phylogenetic, and environmental studies in microbiology. *J.Bacteriol.* **172**:762-770.

Amann, R. I., Ludwig, W., und Schleifer, K. H. (1995) Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiol.Rev.* **59**:143-169.

Andersson, J. O. und Andersson, S. G. (2001) Pseudogenes, junk DNA, and the dynamics of *Rickettsia* genomes. *Mol.Biol.Evol.* **18**:829-839.

Andersson, S. G. und Kurland, C. G. (1995) Genomic evolution drives the evolution of the translation system. *Biochem.Cell Biol.* **73**:775-787.

Andersson, S. G. und Kurland, C. G. (1998) Reductive evolution of resident genomes. *Trends Microbiol.* **6**:263-268.

Andersson, S. G., Stothard, D. R., Fuerst, P., und Kurland, C. G. (1999) Molecular phylogeny and rearrangement of rRNA genes in *Rickettsia* species. *Mol.Biol.Evol.* **16**:987-995.

- Andersson, S. G., Zomorodipour, A., Andersson, J. O., Sicheritz-Ponten, T., Alsmark, U. C., Podowski, R. M., Naslund, A. K., Eriksson, A. S., Winkler, H. H., und Kurland, C. G.** (1998) The genome sequence of *Rickettsia prowazekii* and the origin of mitochondria. *Nature* **396**:133-140.
- Badger, J. H. und Olsen, G. J.** (1999) CRITICA: coding region identification tool invoking comparative analysis. *Mol.Biol.Evol.* **16**:512-524.
- Balch, W. E., Fox, G. E., Magrum, L. J., Woese, C. R., und Wolfe, R. S.** (1979) Methanogens: Reevaluation of a unique biological group. *Microbiol.Rev.* **43**:260-296.
- Balch, W. E., Magrum, L. J., Fox, G. E., Wolfe, R. S., und Woese, C. R.** (1977) An ancient divergence among the bacteria. *J.Mol.Evol.* **9**:305-311.
- Barns, S. M., Fundyga, R. E., Jeffries, M. W., und Pace, N. R.** (1994) Remarkable archaeal diversity detected in a Yellowstone National Park hot spring environment. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* **91**:1609-1613.
- Bateman, A., Birney, E., Cerruti, L., Durbin, R., Etwiller, L., Eddy, S. R., Griffiths-Jones, S., Howe, K. L., Marshall, M., und Sonnhammer, E. L.** (2002) The Pfam protein families database. *Nucleic Acids Res.* **30**:276-280.
- Behrens, S., Ruhland, C., Inacio, J., Huber, H., Fonseca, A., Spencer-Martins, I., Fuchs, B. M., und Amann, R.** (2003) In situ accessibility of small-subunit rRNA of members of the domains Bacteria, Archaea, and Eucarya to Cy3-labeled oligonucleotide probes. *Appl.Environ.Microbiol.* **69**:1748-1758.
- Bernander, R.** (2000) Chromosome replication, nucleoid segregation and cell division in archaea. *Trends Microbiol.* **8**:278-283.
- Bintrim, S. B., Donohue, T. J., Handelsman, J., Roberts, G. P., und Goodman, R. M.** (1997) Molecular phylogeny of Archaea from soil. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **94**:277-282.
- 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. *Arch.Microbiol.* **84**:54-68.
- Brosius, J., Dull, T. J., Sleeter, D. D., und Noller, H. F.** (1981) Gene organization and primary structure of a ribosomal RNA operon from *Escherichia coli*. *J.Mol.Biol.* **148**:107-127.
- Burggraf, S.** (1994) Identifying members of the domain archaea with rRNA-targeted oligonucleotide probes. *Appl.Environ.Microbiol.* **60**:3112-3119.
- Burggraf, S., Huber, H., und Stetter, K. O.** (1997) Reclassification of the crenarchaeal orders and families in accordance with 16S ribosomal RNA sequence data. *Int.J.Syst.Bacteriol.*
- Cann, I. K., Komori, K., Toh, H., Kanai, S., und Ishino, Y.** (1998) A heterodimeric DNA polymerase: evidence that members of Euryarchaeota possess a distinct DNA polymerase. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **95**:14250-14255.

- Chen, X. und Finch, L. R.** (1989) Novel arrangement of rRNA genes in *Mycoplasma gallisepticum*: separation of the 16S gene of one set from the 23S and 5S genes. *J.Bacteriol.* **171**:2876-2878.
- Confalonieri, F., Elie, C., Nadal, M., de La, T. C., Forterre, P., und Duguet, M.** (1993) Reverse gyrase: a helicase-like domain and a type I topoisomerase in the same polypeptide. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **90**:4753-4757.
- Creti, R., Ceccarelli, E., Bocchetta, M., Sanangelantoni, A. M., Tiboni, O., Palm, P., und Cammarano, P.** (1994) Evolution of translational elongation factor (EF) sequences: reliability of global phylogenies inferred from EF-1 alpha(Tu) and EF-2(G) proteins. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **91**:3255-3259.
- De Rijk, P. und De Wachter, R.** (1997) RnaViz, a program for the visualisation of RNA secondary structure. *Nucleic Acids Res.* **25**:4679-4684.
- Delcher, A. L., Harmon, D., Kasif, S., White, O., und Salzberg, S. L.** (1999) Improved microbial gene identification with GLIMMER. *Nucleic Acids Res.* **27**:4636-4641.
- DeLong, E. F.** (1992) Archaea in coastal marine environments. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **89**:5685-5689.
- DeLong, E. F., Wickham, G. S., und Pace, N. R.** (1989) Phylogenetic stains: ribosomal RNA-based probes for the identification of single cells. *Science* **243**:1360-1363.
- DeLong, E. F., Wu, K. Y., Prezelin, B. B., und Jovine, R. V.** (1994) High abundance of Archaea in Antarctic marine picoplankton. *Nature* **371**:695-697.
- Derbyshire, V., Wood, D. W., Wu, W., Dansereau, J. T., Dalgaard, J. Z., und Belfort, M.** (1997) Genetic definition of a protein-splicing domain: functional mini-inteins support structure predictions and a model for intein evolution. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **94**:11466-11471.
- Dirmeier, R., Hauska, G., und Stetter, K. O.** (2000) ATP synthesis at 100 degrees C by an ATPase purified from the hyperthermophilic archaeon *Pyrodictium abyssi*. *FEBS Lett.* **467**:101-104.
- Doolittle, W. F.** (1978) Genes in pieces: Were they ever together? *Nature* **272**:581-582.
- Duan, X., Gimble, F. S., und Quijcho, F. A.** (1997) Crystal structure of PI-SceI, a homing endonuclease with protein splicing activity. *Cell* **89**:555-564.
- Eder, W., Ludwig, W., und Huber, R.** (1999) Novel 16S rRNA gene sequences retrieved from highly saline brine sediments of Kebrit Deep, Red Sea. *Arch.Microbiol.* **172**:213-218.
- Eder, W., Schmidt, M., Koch, M., Garbe-Schonberg, D., und Huber, R.** (2002) Prokaryotic phylogenetic diversity and corresponding geochemical data of the brine-seawater interface of the Shaban Deep, Red Sea. *Environ.Microbiol.* **4**:758-763.
- Embley, T. M. und Finlay, B. J.** (1994) The use of small subunit rRNA sequences to unravel the relationships between anaerobic ciliates and their methanogen endosymbionts. *Microbiology* **140**:225-235.

- Felsenstein, J.** (1978) Cases in which parsimony or compatibility methods will be positively misleading. *Syst.Zool.* **25**:401-410.
- Felsenstein, J.** (2002) PHYLIP (Phylogeny Inference Package). Version 3.6a2.3. Seattle, Department of Genetics, University of Washington. Distributed by the author
- Fiala, G., Stetter, K. O., Jannasch, H. W., Langworthy, T. A., und Madon, J.** (1986) *Staphylothermus marinus* sp.nov. represents a novel genus of extremely thermophilic submarine heterotrophic archaeobacteria growing up to 98°C. *System.Appl.Microbiol.* **8**:106-113.
- Fitz-Gibbon, S. T., Ladner, H., Kim, U. J., Stetter, K. O., Simon, M. I., und Miller, J. H.** (2002) Genome sequence of the hyperthermophilic crenarchaeon *Pyrobaculum aerophilum*. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **99**:984-989.
- Forterre, P.** (1996) A hot topic: the origin of hyperthermophiles. *Cell* **85**:789-792.
- Forterre, P.** (2002) A hot story from comparative genomics: reverse gyrase is the only hyperthermophile-specific protein. *Trends Genet.* **18**:236-237.
- Forterre, P., Bouthier, D. L. T., Philippe, H., und Duguet, M.** (2000) Reverse gyrase from hyperthermophiles: probable transfer of a thermoadaptation trait from archaea to bacteria. *Trends Genet.* **16**:152-154.
- Forterre, P., Confalonieri, F., Charbonnier, F., und Duguet, M.** (1995) Speculations on the origin of life and thermophily: review of available information on reverse gyrase suggests that hyperthermophilic procaryotes are not so primitive. *Orig.Life Evol.Biosph.* **25**:235-249.
- Fraser, C. M., Casjens, S., Huang, W. M., Sutton, G. G., Clayton, R., Lathigra, R., White, O., Ketchum, K. A., Dodson, R., Hickey, E. K., Gwinn, M., Dougherty, B., Tomb, J. F., Fleischmann, R. D., Richardson, D., Peterson, J., Kerlavage, A. R., Quackenbush, J., Salzberg, S., Hanson, M., van Vugt, R., Palmer, N., Adams, M. D., Gocayne, J., und Venter, J. C.** (1997) Genomic sequence of a Lyme disease spirochaete, *Borrelia burgdorferi*. *Nature* **390**:580-586.
- Fraser, C. M., Gocayne, J. D., White, O., Adams, M. D., Clayton, R. A., Fleischmann, R. D., Bult, C. J., Kerlavage, A. R., Sutton, G., und Kelley, J. M.** (1995) The minimal gene complement of *Mycoplasma genitalium*. *Science* **270**:397-403.
- Fraser, C. M., Norris, S. J., Weinstock, G. M., White, O., Sutton, G. G., Dodson, R., Gwinn, M., Hickey, E. K., Clayton, R., Ketchum, K. A., Sodergren, E., Hardham, J. M., McLeod, M. P., Salzberg, S., Peterson, J., Khalak, H., Richardson, D., Howell, J. K., Chidambaram, M., Utterback, T., McDonald, L., Artiach, P., Bowman, C., Cotton, M. D., und Venter, J. C.** (1998) Complete genome sequence of *Treponema pallidum*, the syphilis spirochete. *Science* **281**:375-388.
- Gaasterland, T.** (1999) Archaeal genomics. *Curr.Opin.Microbiol.* **2**:542-547.

- Germot, A., Philippe, H., und Le Guyader, H.** (1997) Evidence for loss of mitochondria in Microsporidia from a mitochondrial-type HSP70 in *Nosema locustae*. *Mol.Biochem.Parasitol.* **87**:159-168.
- Gilbert, W.** (1987) The exon theory of genes. *Cold Spring Harb.Symp.Quant.Biol.* **52**:901-905.
- Graham, D. E., Overbeek, R., Olsen, G. J., und Woese, C. R.** (2000) An archaeal genomic signature. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **97**:3304-3308.
- Grogan, D. W.** (2000) The question of DNA repair in hyperthermophilic archaea. *Trends Microbiol.* **8**:180-185.
- Grosskopf, R., Janssen, P. H., und Liesack, W.** (1998) Diversity and structure of the methanogenic community in anoxic rice paddy soil microcosms as examined by cultivation and direct 16S rRNA gene sequence retrieval. *Appl.Environ.Microbiol.* **64**:960-969.
- Gutell, R. R., Weiser, B., Woese, C. R., und Noller, H. F.** (1985) Comparative anatomy of 16-S-like ribosomal RNA. *Prog.Nucleic Acid Res.Mol.Biol.* **32**:155-216.
- Hall, T. A.** (1999) BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis programm for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symp.Ser.* **41**:95-98.
- Hannahan, D.** (1983) Studies on transformation of *E. coli* with plasmids. *J.Mol.Biol.* **166**:557-580.
- Heinonen, J. K. und Lahti, R. J.** (1981) A new and convenient colorimetric determination of inorganic orthophosphate and its application to the assay of inorganic pyrophosphatase. *Anal.Biochem.* **113**:313-317.
- Hendy, M. und Penny, D.** (1989) A framework for the quantitative study of evolutionary trees. *Syst.Zool.* **38**:297-309.
- Hirt, R. P., Logsdon, J. M., Jr., Healy, B., Dorey, M. W., Doolittle, W. F., und Embley, T. M.** (1999) Microsporidia are related to Fungi: evidence from the largest subunit of RNA polymerase II and other proteins. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **96**:580-585.
- Hochstein, L. I. und Stan-Lotter, H.** (1992) Purification and properties of an ATPase from *Sulfolobus solfataricus*. *Arch.Biochem.Biophys.* **295**:153-160.
- Hohn, M.** (2000) Quantitative und qualitative Untersuchungen zur Effizienz der PCR-Amplifikation von 16S rRNA Genen hyperthermophiler Mikroorganismen sowie molekularbiologische Untersuchungen der "Minikokken" von *Ignicoccus* spec. Diplomarbeit am Lehrstuhl für Mikrobiologie der Universität Regensburg
- Hohn, M. J., Hedlund, B. P., und Huber, H.** (2002) Detection of 16S rDNA sequences representing the novel phylum "Nanoarchaeota": indication for a wide distribution in high temperature biotopes. *System.Appl.Microbiol.* **25**:551-554.
- Huber, H., Burggraf, S., Mayer, T., Wyszchony, I., Rachel, R., und Stetter, K. O.** (2000) *Ignicoccus* gen. nov., a novel genus of hyperthermophilic, chemolithoautotrophic Archaea, represented by two new species, *Ignicoccus islandicus* sp nov and *Ignicoccus pacificus* sp nov. *Int.J.Syst.Evol.Microbiol.* **50**:2093-2100.

- Huber, H., Hohn, M. J., Rachel, R., und Stetter, K. O.** (2003) Nanoarchaeota. *In*: Dworkin, M. et al. (Hrsg.), The Prokaryotes: an evolving electronic resource for the microbiological community, 3rd edition, release 3.13, Springer-Verlag, New York, www.prokaryotes.com
- Huelsenbeck, J. P. und Ronquist, F.** (2001) MRBAYES: Bayesian inference of phylogenetic trees. *Bioinformatics*. **17**:754-755.
- Hugenholtz, P., Pitulle, C., Hershberger, K. L., und Pace, N. R.** (1998) Novel division level bacterial diversity in a Yellowstone hot spring. *J.Bacteriol.* **180**:366-376.
- Inatomi, K.** (1986) Characterization and purification of the membrane-bound ATPase of the archaeobacterium *Methanosarcina barkeri*. *J.Bacteriol.* **167**:837-841.
- Jahn, U.** (2003) Physiologische, molekularbiologische und biochemische Untersuchungen am Organismensystem *Nanoarchaeum equitans* und *Ignicoccus* sp. KIN4/I. Diplomarbeit am Lehrstuhl für Mikrobiologie der Universität Regensburg
- Jukes, T. H. und Cantor, C. R.** (1988) Evolution of protein molecules, pp. 21-132. *In*: H. N. Munro (Hrsg.), Mammalian protein metabolism. Academic Press Inc., New York.
- Kapushoc, S. T., Alfonzo, J. D., Rubio, M. A., und Simpson, L.** (2000) End processing precedes mitochondrial importation and editing of tRNAs in *Leishmania tarentolae*. *J.Biol.Chem.* **275**:37907-37914.
- Karner, M. B., DeLong, E. F., und Karl, D. M.** (2001) Archaeal dominance in the mesopelagic zone of the Pacific Ocean. *Nature* **409**:507-510.
- Katinka, M. D., Duprat, S., Cornillot, E., Metenier, G., Thomarat, F., Prensier, G., Barbe, V., Peyretailade, E., Brottier, P., Wincker, P., Delbac, F., El Alaoui, H., Peyret, P., Saurin, W., Gouy, M., Weissenbach, J., und Vivares, C. P.** (2001) Genome sequence and gene compaction of the eukaryote parasite *Encephalitozoon cuniculi*. *Nature* **414**:450-453.
- Kawarabayasi, Y., Hino, Y., Horikawa, H., Yamazaki, S., Haikawa, Y., Jin-no, K., Takahashi, M., Sekine, M., Baba, S., Ankai, A., Kosugi, H., Hosoyama, A., Fukui, S., Nagai, Y., Nishijima, K., Nakazawa, H., Takamiya, M., Masuda, S., Funahashi, T., Tanaka, T., Kudoh, Y., Yamazaki, J., Kushida, N., Oguchi, A., und Kikuchi, H.** (1999) Complete genome sequence of an aerobic hyper-thermophilic crenarchaeon, *Aeropyrum pernix* K1. *DNA Res.* **6**:83-52.
- Kelman, Z., Pietrokovski, S., und Hurwitz, J.** (1999) Isolation and characterization of a split B-type DNA polymerase from the archaeon *Methanobacterium thermoautotrophicum* deltaH. *J.Biol.Chem.* **274**:28751-28761.
- Keough, B. P., Schmidt, T. M., und Hicks, R. E.** (2003) Archaeal Nucleic Acids in Picoplankton from Great Lakes on Three Continents. *Microb.Ecol.* **46**:238-248.
- Klabunde, T., Sharma, S., Telenti, A., Jacobs, W. R., Jr., und Sacchettini, J. C.** (1998) Crystal structure of GyrA intein from *Mycobacterium xenopi* reveals structural basis of protein splicing. *Nat.Struct.Biol.* **5**:31-36.

- Klenk, H. P., Clayton, R. A., Tomb, J. F., White, O., Nelson, K. E., Ketchum, K. A., Dodson, R. J., Gwinn, M., Hickey, E. K., Peterson, J. D., Richardson, D. L., Kerlavage, A. R., Graham, D. E., Kyrpides, N. C., Fleischmann, R. D., Quackenbush, J., Lee, N. H., Sutton, G. G., Gill, S., Kirkness, E. F., Dougherty, B. A., McKenney, K., Adams, M. D., Loftus, B., und Venter, J. C.** (1997) The complete genome sequence of the hyperthermophilic, sulphate-reducing archaeon *Archaeoglobus fulgidus*. *Nature* **390**:364-370.
- Klenk, H. P. und Zillig, W.** (1994) DNA-dependent RNA polymerase subunit B as a tool for phylogenetic reconstructions: branching topology of the archaeal domain. *J.Mol.Evol.* **38**:420-432.
- Koonin, E. V., Mushegian, A. R., Galperin, M. Y., und Walker, D. R.** (1997) Comparison of archaeal and bacterial genomes: computer analysis of protein sequences predicts novel functions and suggests a chimeric origin for the archaea. *Mol.Microbiol.* **25**:619-637.
- Kronner, M.** (1998) Isolierung und Charakterisierung neuer hyperthermophiler Archaeen aus dem Kolbeinsey-Gebiet vor Island. Schriftliche Hausarbeit am Lehrstuhl für Mikrobiologie der Universität Regensburg
- Laemmli, U. K.** (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**:680-685.
- Lathe, R.** (1985) Synthetic oligonucleotide probes deduced from amino acid sequence data. Theoretical and practical considerations. *J.Mol.Biol.* **183**:1-12.
- Lazcano, A. und Miller, S. L.** (1999) On the origin of metabolic pathways. *J.Mol.Evol.* **49**:424-431.
- Liesack, W. und Stackebrandt, E.** (1992) Occurrence of novel groups of the domain Bacteria as revealed by analysis of genetic material isolated from an Australian terrestrial environment. *J.Bacteriol.* **174**:5072-5078.
- Lindahl, T.** (1993) Instability and decay of the primary structure of DNA. *Nature* **362**:709-715.
- Lingl, A., Huber, H., Stetter, K. O., Mayer, F., Kellermann, J., und Muller, V.** (2003) Isolation of a complete A1AO ATP synthase comprising nine subunits from the hyperthermophile *Methanococcus jannaschii*. *Extremophiles.* **7**:249-257.
- Lottspeich, F. und Zorbas, H.** (1998) Konzentrationsbestimmung von Nucleinsäuren, pp. 574-575. *In: Bioanalytik. Spektrum, Akad. Verl., Heidelberg, Berlin.*
- Lowe, T. M. und Eddy, S. R.** (1997) tRNAscan-SE: a program for improved detection of transfer RNA genes in genomic sequence. *Nucleic Acids Res.* **25**:955-964.
- Ludwig, W. und Strunk, O.** (1997) ARB: a software environment for sequence data. <http://www.mikro.biologie.tu-muenchen.de/pub/ARB/documentation/arb.ps>
- Massana, R., Murray, A. E., Preston, C. M., und DeLong, E. F.** (1997) Vertical distribution and phylogenetic characterization of marine planktonic Archaea in the Santa Barbara Channel. *Appl.Environ.Microbiol.* **63**:50-56.

- Matte-Tailliez, O., Brochier, C., Forterre, P., und Philippe, H.** (2002) Archaeal phylogeny based on ribosomal proteins. *Mol.Biol.Evol.* **19**:631-639.
- Miller, J. H.** (1972) Experiments in molecular genetics. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.
- Mills, K. V., Lew, B. M., Jiang, S., und Paulus, H.** (1998) Protein splicing in trans by purified N- and C-terminal fragments of the *Mycobacterium tuberculosis* RecA intein. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **95**:3543-3548.
- Moran, N. A.** (1996) Accelerated evolution and Muller's ratchet in endosymbiotic bacteria. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **93**:2873-2878.
- Moran, N. A. und Wernegreen, J. J.** (2000) Lifestyle evolution in symbiotic bacteria: insights from genomics. *Trends in Ecology and Evolution* **15**:321-326.
- Morl, M., Dorner, M., und Paabo, S.** (1995) C to U editing and modifications during the maturation of the mitochondrial tRNA(Asp) in marsupials. *Nucleic Acids Res.* **23**:3380-3384.
- Mulder, N. J., Apweiler, R., Attwood, T. K., Bairoch, A., Barrell, D., Bateman, A., Binns, D., Biswas, M., Bradley, P., Bork, P., Bucher, P., Copley, R. R., Courcelle, E., Das, U., Durbin, R., Falquet, L., Fleischmann, W., Griffiths-Jones, S., Haft, D., Harte, N., Hulo, N., Kahn, D., Kanapin, A., Krestyaninova, M., Lopez, R., et al.** (2003) The InterPro Database, 2003 brings increased coverage and new features. *Nucleic Acids Res.* **31**:315-318.
- Munson, M. A., Nedwell, D. B., und Embley, T. M.** (1997) Phylogenetic diversity of Archaea in sediment samples from a coastal salt marsh. *Appl.Environ.Microbiol.* **63**:4729-4733.
- Myers, E. W., Sutton, G. G., Delcher, A. L., Dew, I. M., Fasulo, D. P., Flanigan, M. J., Kravitz, S. A., Mobarry, C. M., Reinert, K. H., Remington, K. A., Anson, E. L., Bolanos, R. A., Chou, H. H., Jordan, C. M., Halpern, A. L., Lonardi, S., Beasley, E. M., Brandon, R. C., Chen, L., Dunn, P. J., Lai, Z., Liang, Y., Nusskern, D. R., Zhan, M., Zhang, Q., et al.** (2000) A whole-genome assembly of *Drosophila*. *Science* **287**:2196-2204.
- Olsen, G. J., Lane, D. J., Giovannoni, S. J., Pace, N. R., und Stahl, D. A.** (1986) Microbial ecology and evolution: a ribosomal RNA approach. *Annu.Rev.Microbiol.* **40**:337-365.
- Palleroni, N. J.** (1997) Prokaryotic diversity and the importance of culturing. *Antonie Van Leeuwenhoek* **72**:3-19.
- Paulsen, I. T., Sliwinski, M. K., und Saier, M. H., Jr.** (1998) Microbial genome analyses: global comparisons of transport capabilities based on phylogenies, bioenergetics and substrate specificities. *J.Mol.Biol.* **277**:573-592.
- Perler, F. B.** (2002) InBase: the Intein Database. *Nucleic Acids Res.* **30**:383-384.

- Perler, F. B., Comb, D. G., Jack, W. E., Moran, L. S., Qiang, B., Kucera, R. B., Benner, J., Slatko, B. E., Nwankwo, D. O., Hempstead, S. K., und .** (1992) Intervening sequences in an Archaea DNA polymerase gene. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **89**:5577-5581.
- Perler, F. B., Davis, E. O., Dean, G. E., Gimble, F. S., Jack, W. E., Neff, N., Noren, C. J., Thorner, J., und Belfort, M.** (1994) Protein splicing elements: inteins and exteins-a definition of terms and recommended nomenclature. *Nucleic Acids Res.* **22**:1125-1127.
- Perler, F. B., Olsen, G. J., und Adam, E.** (1997) Compilation and analysis of intein sequences. *Nucleic Acids Res.* **25**:1087-1093.
- Preston, C. M., Wu, K. Y., Molinski, T. F., und DeLong, E. F.** (1996) A psychrophilic crenarchaeon inhabits a marine sponge: *Cenarchaeum symbiosum* gen. nov., sp. nov. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **93**:6241-6246.
- Raskin, L., Stromley, J. M., Rittmann, B. E., und Stahl, D. A.** (1994) Group-specific 16S rRNA hybridization probes to describe natural communities of methanogens. *Appl.Environ.Microbiol.* **60**:1232-1240.
- Renesto, P., Crapoulet, N., Ogata, H., La Scola, B., Vestris, G., Claverie, J. M., und Raoult, D.** (2003) Genome-based design of a cell-free culture medium for *Tropheryma whipplei*. *Lancet* **362**:447-449.
- Ruepp, A., Graml, W., Santos-Martinez, M. L., Koretke, K. K., Volker, C., Mewes, H. W., Frishman, D., Stocker, S., Lupas, A. N., und Baumeister, W.** (2000) The genome sequence of the thermoacidophilic scavenger *Thermoplasma acidophilum*. *Nature* **407**:508-513.
- 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.
- Saiki, R. K., Scharf, S. J., Faloona, F., Mullis, K. B., Horn, G. T., Erlich, H. A., und Arnheim, N.** (1985) Enzymatic amplification of β -globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* **230**:1350-1354.
- Sambrook, J.** (1989) *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- Sandler, S. J., Hugenholtz, P., Schleper, C., DeLong, E. F., Pace, N. R., und Clark, A. J.** (1999) Diversity of radA genes from cultured and uncultured archaea: comparative analysis of putative RadA proteins and their use as a phylogenetic marker. *J.Bacteriol.* **181**:907-915.
- Sanger, F., Nicklen, S., und Coulson, A. R.** (1977) DNA sequencing with chain terminating inhibitors. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* **74**:5463-5467.
- Schleper, C., Holben, W., und Klenk, H. P.** (1997) Recovery of crenarchaeotal ribosomal DNA sequences from freshwater-lake sediments. *Appl.Environ.Microbiol.* **63**:321-323.

- Shigenobu, S., Watanabe, H., Hattori, M., Sakaki, Y., und Ishikawa, H.** (2000) Genome sequence of the endocellular bacterial symbiont of aphids *Buchnera* sp. APS. Nature **407**:81-86.
- Shingledecker, K., Jiang, S. Q., und Paulus, H.** (1998) Molecular dissection of the *Mycobacterium tuberculosis* RecA intein: design of a minimal intein and of a trans-splicing system involving two intein fragments. Gene **207**:187-195.
- Snel, B., Bork, P., und Huynen, M. A.** (1999) Genome phylogeny based on gene content. Nat.Genet. **21**:108-110.
- Southworth, M. W., Adam, E., Panne, D., Byer, R., Kautz, R., und Perler, F. B.** (1998) Control of protein splicing by intein fragment reassembly. EMBO J. **17**:918-926.
- Staden, R., Beal, K. F., und Bonfield, J. K.** (2000) The Staden package, 1998. Methods Mol.Biol. **132**:115-130.
- Stahl, A. D. und Amann, R. I.** (1991) Development and application of nucleic acid probes in bacterial systematics., In: E. Stackebrandt und M. Goodfellow (Hrsg.), Sequencing and hybridisation techniques in bacterial systematics. John Wiley & Sons, Chichester, England.
- Stephens, R. S., Kalman, S., Lammel, C., Fan, J., Marathe, R., Aravind, L., Mitchell, W., Olinger, L., Tatusov, R. L., Zhao, Q., Koonin, E. V., und Davis, R. W.** (1998) Genome sequence of an obligate intracellular pathogen of humans: *Chlamydia trachomatis*. Science **282**:754-759.
- Stetter, K. O.** (1989) Extremely thermophilic chemolithoautotrophic archaeobacteria, pp. 167-176. In: H. G. Schlegel und B. Bowien (Hrsg.), Autotrophic Bacteria. Springer, Berlin, Heidelberg, London, Paris, Tokyo.
- Stetter, K. O.** (1992) Life at the upper temperature border, pp. 195-219. In: J. Tran Than Van, K. Tran Than Van, J. C. Mounolou, J. Schneider, und C. McKay (Hrsg.), *Frontiers of Life*. Editions Frontières, Gif-sur-Yvette.
- Stetter, K. O.** (1994) The lesson of Archaeobacteria, pp. 143-151. In: S. Bengtson (Hrsg.), Nobel symposium No.84. Columbia University Press, New York.
- Stetter, K. O.** (1995) Microbial life in hyperthermal environments. ASM News **61**:285-290.
- Stetter, K. O.** (1996) Hyperthermophilic procaryotes. FEMS Microbiol.Rev. **18**:149-158.
- Stetter, K. O.** (1998) Smallest cell sizes within hyperthermophilic archaea ("Archaeobacteria"). In: Space studies board (Hrsg.) Size Limits of Very Small Microorganisms; Proceedings of a Workshop. National Academic Press, Washington DC, pp. 68-73.
- Stetter, K. O.** (1999) Extremophiles and their adaptation to hot environments. FEBS Lett. **452**:22-25.
- Stetter, K. O., König, H., und Stackebrandt, E.** (1983) *Pyrodictium* gen. nov., a new genus of submarine disc-shaped sulphur reducing archaeobacteria growing optimally at 105°C. System.Appl.Microbiol. **4**:535-551.

- Stoltzfus, A., Logsdon, J. M., Jr., Palmer, J. D., und Doolittle, W. F.** (1997) Intron "sliding" and the diversity of intron positions. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **94**:10739-10744.
- Swafford, D. L.** (1996) PAUP*: Phylogenetic analysis using parsimony and other methods. Version 4. Sunderland, MA., Sinauer, Assoc.
- Taschke, C. und Herrmann, R.** (1986) Analysis of transcription and processing signals of the 16S-23S rRNA operon of *Mycoplasma hyopneumoniae*. *Mol.Gen.Genet.* **205**:434-441.
- Thompson, J. D., Higgins, D. G., und Gibson, T. J.** (1994) CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.* **22**:4673-4680.
- Venter, J. C., Adams, M. D., Myers, E. W., Li, P. W., Mural, R. J., Sutton, G. G., Smith, H. O., Yandell, M., Evans, C. A., Holt, R. A., Gocayne, J. D., Amanatides, P., Ballew, R. M., Huson, D. H., Wortman, J. R., Zhang, Q., Kodira, C. D., Zheng, X. H., Chen, L., Skupski, M., Subramanian, G., Thomas, P. D., Zhang, J., Gabor Miklos, G. L., Nelson, C., et al.** (2001) The sequence of the human genome. *Science* **291**:1304-1351.
- Wang, T. S., Wong, S. W., und Korn, D.** (1989) Human DNA polymerase alpha: predicted functional domains and relationships with viral DNA polymerases. *FASEB J.* **3**:14-21.
- Ward, D. M., Weller, R., und Bateson, M. M.** (1990) 16S rRNA sequences revealed numerous uncultured inhabitants in a natural community. *Nature* **345**:63-65.
- Waters, E., Hohn, M. J., Ahel, I., Graham, D. E., Adams, M. D., Barnstead, M., Beeson, K. Y., Bibbs, L., Bolanos, R., Keller, M., Kretz, K., Lin, X., Mathur, E., Ni, J., Podar, M., Richardson, T., Sutton, G. G., Simon, M., Söll, D., Stetter, K. O., Short, J. M., und Noordevier, M.** (2003) The genome of *Nanoarchaeum equitans*: Insights into early archaeal evolution and derived parasitism. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **100**:12984-12988.
- Woese, C.** (1998) The universal ancestor. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **95**:6854-6859.
- Woese, C. R.** (1987) Bacterial evolution. *Microbiol.Rev.* **51**:221-271.
- Woese, C. R. und Fox, G. E.** (1977) Phylogenetic structure of the prokaryotic domain: the primary kingdoms. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 5088-5090.
- Woese, C. R., Kandler, O., und Wheelis, M. L.** (1990) Towards a natural system of organisms: Proposal for the domains *archaea*, *bacteria* and *eucarya*. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* **87**:4576-4579.
- Wolf, Y. I., Rogozin, I. B., Grishin, N. V., Tatusov, R. L., und Koonin, E. V.** (2001) Genome trees constructed using five different approaches suggest new major bacterial clades. *BMC.Evol.Biol.* **1**:8.

Wu, H., Hu, Z., und Liu, X. Q. (1998a) Protein trans-splicing by a split intein encoded in a split DnaE gene of *Synechocystis* sp. PCC6803. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **95**:9226-9231.

Wu, H., Xu, M. Q., und Liu, X. Q. (1998b) Protein trans-splicing and functional mini-inteins of a cyanobacterial dnaB intein. *Biochim.Biophys.Acta* **1387**:422-432.

Zengler, K., Toledo, G., Rappe, M., Elkins, J., Mathur, E. J., Short, J. M., und Keller, M. (2002) Cultivating the uncultured. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **99**:15681-15686.

Zwieb, C. und Eichler, J. (2002) Getting on target: The archaeal signal recognition particle. *Archaea* **1**:27-34.

Viele haben zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen. Mein besonderer Dank gilt:

Herrn **Prof. Stetter**, der mir die Anfertigung dieser Arbeit ermöglicht und ihren Fortgang immer mit größtem Interesse verfolgt hat. Mit seinen hilfreichen Anregungen und mitreißenden wissenschaftlichen Diskussionen hat er meine Arbeit voran gebracht, mich aber stets auch ermutigt eigene Ideen zu verwirklichen. Das in mich gesetzte Vertrauen und die Möglichkeit, zu jeder Zeit Anliegen wissenschaftlicher und auch persönlicher Natur offen zu besprechen, waren für mich die größte Motivation. Ganz besonders möchte ich mich für die Ermöglichung des Forschungsaufenthalts bei Diversa in San Diego und für die Teilnahme an der Gordon-Konferenz bedanken. Herzlichen Dank auch für die gemeinsame Expedition nach Vulcano, die ich sehr genossen habe und die mir in unvergesslicher Erinnerung bleiben wird.

Dr. Harald Huber für die freundliche Aufnahme in seinem Labor und die tatkräftige Unterstützung meiner Arbeit durch zahlreiche anregende Diskussionen und hilfreiche Ratschläge.

Dr. Martin Keller und **Dr. Eric Mathur** für die freundliche Aufnahme bei Diversa und die Möglichkeit dort zu arbeiten. **Dr. Elisabeth Waters** für die fundierte Einführung in die computergestützte Auswertung von Genomdaten und **Dr. Mircea Podar** für die enthusiastische Vermittlung von Theorie und Praxis bei der Erstellung phylogenetischer Bäume.

Herrn **Prof. Müller** an der LMU in München für die freundliche Aufnahme in seinem Labor und für hilfreiche Diskussionen. **Astrid Lingl** für ihre große Hilfe und die viele Zeit, die sie sich für die Vermittlung der benötigten Arbeitstechniken genommen hat. Herzlichen Dank auch für das bereitwillige Teilen des Laborplatzes.

Verena Wimmer am MPI für medizinische Forschung in Heidelberg für ihre Hilfe bei der Erstellung confokaler Bilderserien und für ihre Freundschaft.

Ulrike Jahn für ihre stete Hilfsbereitschaft im Labor, die vielen unterhaltsamen Diskussionen über eigentlich alles und jedes und für die Süßigkeiten, die mich so oft vor dem Verhungern gerettet haben. Ein besonderer Dank auch für das rigorose Ausmerzen der vielen Komma- und Rechtschreibfehler!

Gabi Gmeinwieser und **Kerstin Roth** für das freundschaftliche Arbeitsklima und für den reibungslosen Ablauf des Laboralltags. Ein großes Dankeschön an Gabi, die in ihrer Funktion als Ersthelferin stets darum besorgt war, meinen Koffeinspiegel im grünen Bereich zu halten.

Thomas Hader und **Konrad Eichinger** für die tatkräftige Hilfe bei der Fermentation.

Elisabeth Nagelfeld für ihre große Hilfe bei allen verwaltungstechnischen Fragen und ihre aufmunternden Worte in verzweifelten Situationen.

Monika Häring und **Meik Sacher** möchte ich herzlich für zahllose wissenschaftliche und unwissenschaftliche Gespräche und für das gründliche Korrekturlesen der Arbeit danken.

Allen nicht namentlich genannten Mitgliedern des Lehrstuhls danke ich für ein hervorragendes Arbeitsklima und die große Hilfsbereitschaft.

Nicht zuletzt gilt mein spezieller Dank meinen **Eltern**, die mich während meiner Studiums- und Promotionszeit immer durch ihr Interesse und ihr Verständnis unterstützt haben.

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

Regensburg, November 2003