

Einblicke in die Interaktion zwischen  
*Ignicoccus hospitalis* und *Nanoarchaeum equitans*:  
Das Membranprotein Ihomp1  
sowie Nachweis weiterer Proteine der Zellhüllen



**Dissertation**

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

vorgelegt von  
**Tillmann Burghardt**  
aus Regensburg

November 2008



Diese Arbeit wurde angeleitet von PD Dr. Reinhard Rachel

Promotionsgesuch eingereicht am: 03. November 2008

Tag der mündlichen Prüfung: 18. Dezember 2008

Prüfungsausschuss:	Vorsitzender	Prof. Dr. Ralph Witzgall
	1. Gutachter und Prüfer	PD Dr. Reinhard Rachel
	2. Gutachter und Prüfer	Prof. Dr. Reinhard Wirth
	3. Prüfer	Prof. Dr. Reinhard Sterner
	Ersatzprüfer	Prof. Dr. Stephan Schneuwly



**Meinen Eltern  
in Liebe und Dankbarkeit**



## Publikationsliste

Burghardt T., Näther D.J., Junglas B., Huber H. und Rachel R. (2007). The dominating outer membrane protein of the hyperthermophilic Archaeum *Ignicoccus hospitalis*: a novel pore-forming complex. *Molecular Microbiology* 63, (1), 166-176.

Paper W., Jahn U., Hohn M.J., Kronner M., Näther D.J., Burghardt T., Rachel R., Stetter K.O. und Huber H. (2007). *Ignicoccus hospitalis* sp. nov., the host of 'Nanoarchaeum equitans'. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 57, 803-808.

Burghardt T., Saller M., Gürster S., Müller D., Meyer C., Jahn U., Hochmut E., Deutzmann R., Babinger P., Wirth R., Huber H. und Rachel R. (2008). Insights into the proteome of the hyperthermophilic Crenarchaeum *Ignicoccus hospitalis*: the major cytosolic and membrane proteins. *Archives of Microbiology*, 190, 379-394.

Junglas B., Briegel A., Burghardt T., Walter P., Huber H. und Rachel R. (2008). *Ignicoccus hospitalis* and *Nanoarchaeum equitans*: Ultrastructure, cell-cell interaction, and 3D reconstruction from serial sections of freeze-substituted cells and by electron cryotomography. *Archives of Microbiology*, 190, 395-40.

Burghardt T., Junglas B., Wasserburger N., Meyer C., Siedler F., Deutzmann R., Wirth R., Huber H. und Rachel R. (2008). On the interaction of *Nanoarchaeum equitans* with *Ignicoccus hospitalis*: Proteins in the contact site between two cells. *Biochemical Society Transactions*, submitted.



# Inhaltsverzeichnis

<b>I</b>	<b>EINLEITUNG</b>	<b>1</b>
1	Die Zellen der Co-Kultur – Morphologie und Physiologie	2
2	Modelle der Interaktion zwischen <i>I. hospitalis</i> und <i>N. equitans</i>	4
3	Aspekte der Zellhüllstrukturen von <i>I. hospitalis</i> und <i>N. equitans</i>	7
4	Die dominierende Proteinspezies der äußeren Membran von <i>I. hospitalis</i> , Ihomp1	9
5	Zielstellung	10
<b>II</b>	<b>MATERIAL UND METHODEN</b>	<b>11</b>
<b>1</b>	<b>Substanzen und Bezugsquellen</b>	<b>11</b>
1.1	Chemikalien	11
1.2	Molekularmassenstandards	12
1.3	Enzyme/kommerzielle Puffer	12
1.4	Antikörper	12
1.5	Organismen	13
<b>2</b>	<b>Kulturmedien</b>	<b>13</b>
2.1	Zusammensetzung des $\frac{1}{2}$ SME Kulturmediums	13
2.2	Herstellung der Kulturmedien	14
2.2.1	Kleinmaßstab – 20 ml Serumflaschen	14
2.2.2	Großmaßstab – Vorkulturen und Fermenter	14
<b>3</b>	<b>Sterilisation</b>	<b>15</b>
<b>4</b>	<b>Kultivierung und Ernte</b>	<b>15</b>
4.1	Kultivierung im Kleinmaßstab	15
4.2	Kultivierung im Großmaßstab	15
4.3	Zellernte	16
<b>5</b>	<b>Isolation der Zellbestandteile</b>	<b>16</b>
5.1	Zellaufschluss	16
5.2	Dichtegradienten-Zentrifugation	17
5.3	Isolation und Dialyse der Fraktionen	17
<b>6</b>	<b>Proteinbiochemische Methoden</b>	<b>18</b>
6.1	Proteinkonzentrationsbestimmung	18
6.2	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	18
6.2.1	Herstellung der Gele	18
6.2.2	Probenvorbereitung	19
6.2.3	Elektrophoresebedingungen	19

6.2.4 Färbungsmethoden und Dokumentation	20
6.3 Western-Blot	22
6.3.1 Elektroblot von Proteinen auf PVDF-Membranen	22
6.3.2 Immunologischer Nachweis	22
<b>7 Solubilisierung der Membranfraktion</b>	<b>23</b>
<b>8 Proteinaufreinigung</b>	<b>24</b>
8.1 Ionenaustauscher-Chromatographie	24
8.1.1 Durchführung	25
8.2 Gelfiltrations-Chromatographie	26
8.2.1 Durchführung	26
8.3 Reinheitskontrolle der aufgereinigten Fraktionen	26
<b>9 Circulardichroismus-Spektroskopie</b>	<b>27</b>
<b>10 Stöchiometrische Analysen - LILBID Massenspektrometrie</b>	<b>28</b>
10.1 Vorbereitungen für die LILBID Massenspektrometrie	28
<b>11 3D-Kristallisation für die Röntgenstrukturanalyse</b>	<b>29</b>
<b>12 Elektrophysiologische Studien</b>	<b>30</b>
<b>13 Proteinidentifikation</b>	<b>31</b>
13.1 N-terminale Sequenzierung	31
13.2 Massenspektrometrie	32
13.2.1 MALDI MS/MS	33
13.2.2 ESI Nano-LC MS/MS	34
13.3 Bioinformatische Auswertung von Proteinsequenzen	35
<b>14 Molekulargenetische Methoden</b>	<b>37</b>
14.1 DNA-Isolation	37
14.2 Bestimmung der DNA-Konzentration	38
14.3 Polymerase-Kettenreaktion	38
14.4 Agarosegelektrophorese	39
<b>15 Mikroskopie</b>	<b>40</b>
15.1 Lichtmikroskopie	40
15.2 Elektronenmikroskopie	40
<b>16 Immunlokalisation an Gefrierbrüchen</b>	<b>40</b>
16.1 Probenvorbereitung	41
16.2 Gefrierätzung und Schwermetallbedampfung	41
16.3 Immunologischer Nachweis	42

<b>III</b>	<b>ERGEBNISSE</b>	<b>43</b>
<b>1</b>	<b>Isolation der äußeren Membran von <i>Ignicoccus hospitalis</i> aus Rein- und Co-Kultur</b>	<b>43</b>
<b>2</b>	<b>Charakterisierung des dominierenden Proteins der äußeren Membran von <i>I. hospitalis</i> - Ihomp1</b>	<b>45</b>
2.1	Identifikation der dominierenden Proteine der Fraktionen der Membranpräparation	45
2.2	Lokalisation in <i>Ignicoccus hospitalis</i>	48
2.3	Verbreitung innerhalb der Gattung <i>Ignicoccus</i>	50
2.3.1	Western-Blot Analyse	50
2.3.2	SDS - Freeze fracture replica labeling	51
2.3.3	PCR - Analyse	52
2.4	Native Proteinaufreinigung	53
2.4.1	Solubilisierung der Proteine der Membranfraktion	53
2.4.2	Chromatographische Auftrennung der Proteine der Membranfraktion über Gelfiltration	55
2.4.3	Native Proteinaufreinigung	57
2.5	Primärstrukturanalyse	61
2.6	Sekundärstrukturanalyse	63
2.6.1	Bioinformatischer Ansatz	63
2.6.2	Experimenteller Ansatz	64
2.7	Untersuchungen zu den Ihomp1-Komplexen	66
2.7.1	Stöchiometrie	67
2.7.2	Röntgenkristallstrukturanalyse	69
2.7.3	Elektrophysiologische Studien	70
<b>3</b>	<b>Proteinanalytik der Rein und Co-Kultur</b>	<b>74</b>
3.1	Untersuchungen der Reinkultur	74
3.1.1	Gelchromatographische Auftrennung und massenspektrometrische Analyse der Zellhüllfraktion	75
3.2	Untersuchungen der Co-Kultur	81
3.2.1	Gelchromatographische Auftrennung der Zellhüllfraktion	82
3.2.2	Massenspektrometrische Analyse der gewonnenen Peak-Fraktionen	83
3.2.3	Klassifizierung der identifizierten Proteinspezies in COG-Kategorien	86
3.2.4	Identifizierung mutmaßlicher Membranproteine	88
3.2.5	Analysen bezüglich eines mutmaßlichen lateralen Gentransfers	96
<b>IV</b>	<b>DISKUSSION</b>	<b>98</b>
1	Die Rolle von Ihomp1 in Bezug auf die Interaktion zwischen <i>I. hospitalis</i> und <i>N. equitans</i>	98
2	Physiologische Bedeutung von Ihomp1 in <i>I. hospitalis</i>	102
	Die Ihomp1-Komplexe als funktionelle Einheit der 7 nm-Partikel der äußeren Membran	102
	Physiologische Bedeutung der Ihomp1-Komplexe in der äußeren Membran	104
	Physiologische Bedeutung der Ihomp1-Komplexe in <i>I. hospitalis</i>	108
3	Vergleiche der Struktur der Ihomp1-Komplexe mit klassischen Transmembranstrukturen	110

<b>V</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG</b>	<b>116</b>
<b>VI</b>	<b>ANHANG</b>	<b>117</b>
1	Abkürzungsverzeichnis	117
2	Begleit-CD	119
3	Tabellen	120
<b>VII</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS</b>	<b>123</b>

## I Einleitung

Das Organismensystem *Ignicoccus hospitalis* und *Nanoarchaeum equitans* repräsentiert eine innerhalb der Dömane der Archaea bislang einzigartige Biozönose. Die Co-Kultur wurde aus einer Verlängerung des Mittelatlantischen Rückens nördlich von Island, dem Kolbeinsey-Rücken, aus einer Tiefe von 106 m aus dem Gestein eines schwarzen Rauchers (*black smoker*) isoliert (Fricke *et al.*, 1989; Huber *et al.*, 2000; Paper *et al.*, 2007). Im Gegensatz zu der Spezies *N. equitans*, welche bislang lediglich in Gemeinschaft mit *I. hospitalis* gezüchtet werden konnte, konnte der als Wirtsorganismus bezeichnete Stamm *I. hospitalis* durch Vereinzelung bereits in Reinkultur gebracht werden (Paper *et al.*, 2007). Eine eindeutige Zuordnung der Co-Kultur zu einer klassischen Form der Symbiose, des Kommensalismus oder des Parasitismus, kann gegenwärtig jedoch nicht getroffen werden (Huber *et al.*, 2002; 2003; Jahn *et al.*, 2008).

Da die optimale Wachstumstemperatur beider Organismen etwa 90°C beträgt, stellt das System neben der ersten rein archaeellen auch die erste beschriebene rein hyperthermophile Lebensgemeinschaft dar (Stetter, 1989). Dabei wachsen die Zellen der Co-Kultur in einem Temperaturbereich von 73 bis 98 °C unter strikt anoxischen und leicht sauren bis neutralen pH-Bedingungen (Paper *et al.*, 2007, Huber *et al.*, 2002).

Während der Stamm *I. hospitalis* eindeutig dem Phylum der Crenarchaeota zugeordnet werden kann, ist die phylogenetische Einordnung von *N. equitans* Gegenstand anhaltender Diskussionen. Im Jahre 2002 wurde für die Spezies auf Grundlage der 16S rRNA-Gensequenz, neben den bereits bestehenden archaeellen Phyla der Cren-, Eury- und Korarchaeota, (Woese *et al.*, 1990; Barns *et al.*, 1994) mit den Nanoarchaeota ein vierter Phylum eingeführt (Huber *et al.*, 2002). Diese Einteilung ist auf signifikante Basenaustausche in einer vormals als konserviert geltenden, sogenannten "universellen Sequenzsignatur" der 16S rRNA-Gensequenz von *N. equitans* begründet (Huber *et al.*, 2002). Obwohl die taxonomische Einordnung in ein separates archaeelles Phylum in späteren, unabhängigen Arbeiten bestätigt werden konnte (Waters *et al.*, 2003), werden die Ergebnisse der phylogenetischen Analysen angezweifelt, sodass verschiedene Forschergruppen in Abhängigkeit von der Berechnungsmethode und dem verwendeten chronologischen Marker eine Zuordnung in das Phylum der Euryarchaeota (Brochier *et al.*, 2005; 2008) bzw. der Crenarchaeota (Ciccarelli *et al.*, 2006) vorschlagen. Für eine korrekte phylogenetische Einordnung der *Nanoarchaeen* ist die Isolation und Kultivierung weitere Spezies dieser Gattung zwingend erforderlich. Zwar konnten sowohl in submarinen als auch in kontinentalen Hochtemperatur-Ökosystemen bereits weitere Vertreter dieses Phylums nachgewiesen werden, die unternommenen Kultivierungsversuche zeigten jedoch bislang keinen Erfolg (Hohn *et al.*, 2002; McCliment *et al.*, 2006; Casanueva *et al.*, 2008).

Anders verhält es sich im Falle der Gattung *Ignicoccus*, welche im Jahr 2000 anhand der Spezies *Ignicoccus islandicus* und *Ignicoccus pacificus* eindeutig als Vertreter der *Desulfurococcales*, einer Ordnung des archaeellen Phylums der Crenarchaeota, beschrieben wurde (Huber *et al.*, 2000). Kürzlich wurde die Gattung um den bereits erwähnten Wirtsstamm *Ignicoccus hospitalis* erweitert. Die taxonomische Einordnung von *I. hospitalis* in diese, tief im phylogenetischen Stammbaum abzweigende Gattung erfolgte auf Grundlage von 16S rRNA-Genanalysen (Woese und Fox, 1977, Woese, 1987; Paper *et al.*, 2007).

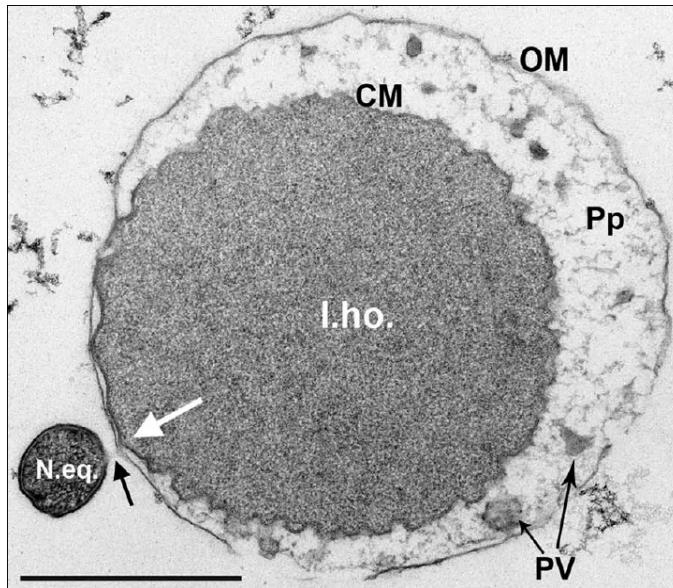
Alle bisher beschriebenen Vertreter der Gattung *Ignicoccus* wurden aus marinen Hydrothermal-Ökosystemen isoliert. Dabei stammt *I. islandicus*, ähnlich wie *I. hospitalis*, aus dem *black smoker*-Areal des Kolbeinsey-Rückens nördlich von Island und wurde aus einer Probe sandigen Sedimentes aus einer Tiefe von über 100 m angereichert. Bei der Spezies *I. pacificus* hingegen handelt es sich um das Isolat einer Gesteinsprobe eines *black smokers* des Ostpazifischen Rückens, welche aus einer Tiefe von 2500 m gewonnen wurde (Huber *et al.*, 2000).

## 1 Die Zellen der Co-Kultur – Morphologie und Physiologie

Die Zellen der Gattung *Ignicoccus* treten einzeln oder in Paaren auf, sind mit einem Zelldurchmesser von 1 bis 3  $\mu\text{m}$  (in Ausnahmen bis 6  $\mu\text{m}$ ) morphologisch unregelmäßig kokkoid und tragen bis zu neun Zellanhänge (Huber *et al.*, 2000, Paper *et al.*, 2007). Allen bislang beschriebenen Arten der Gattung ist eine strikt anaerobe, obligat chemolithoautotrophe Lebensweise gemein. Sie beziehen ihre Energie aus der Reduktion von elementarem Schwefel mit molekularem Wasserstoff unter Bildung von Schwefelwasserstoff und decken ihren Kohlenstoffbedarf durch die Fixierung von Kohlenstoffdioxid. Nachdem frühere Untersuchungen bereits vermuten ließen, dass die Gattung *Ignicoccus* für diesen Assimilationsschritt nicht den klassischen  $\text{CO}_2$ -Fixierungswegen folgt (Hügler *et al.*, 2003), konnte für *I. hospitalis* durch enzymatische und genomische Analysen sowie durch  $^{13}\text{C}$ -Langzeit-Markierungen von Aminosäuren ein neuartiger  $\text{CO}_2$ -Fixierungsweg beschrieben werden, welcher auf einer zweistufigen Carboxylierung des primären  $\text{CO}_2$ -Akzeptors Acetyl-CoA beruht und entsprechend seiner charakteristischen Intermediate als Dicarbonat/4-Hydroxybutyrat-Zyklus bezeichnet wird (Jahn *et al.*, 2007; Huber *et al.*, 2008).

Durch elektronenmikroskopische Analysen an Ultradünnnschnittpräparaten der Rein- und Co-Kultur konnten weitere, ultrastrukturelle Besonderheiten der Gattung *Ignicoccus* aufgedeckt werden. So stellt *Ignicoccus* neben *Thermosphaera* die einzige Gattung innerhalb der Crenarchaeota dar, welche keinen *Surface-Layer* (S-Layer) als äußerste Zellhüllschicht aufweist. Diese Oberflächenschicht, welche als häufiger Bestandteil der prokaryotischen Zellhülle bei über neunzig Prozent der Archaea zu finden ist, wird sowohl als Stützschicht als auch in Zusammenhang mit Zell-Zell-Kontakten oder der Adhäsion von Mikroorganismen an

Oberflächen beschrieben (Engelhardt und Peters, 1998; Sára und Sleytr, 2000; Engelhardt, 2007a und 2007b). Zudem konnten bislang keinerlei stabilisierende Zellwandpolymere in den Zellhüllen der Gattung *Ignicoccus* identifiziert werden. Das wohl markanteste ultrastrukturelle Merkmal der Gattung *Ignicoccus* ist eine in der Domäne der Archaea einzigartige äußere Membran, welche einen 20 bis 400 nm weiten periplasmatischen Raum über der Cytoplasmamembran aufspannt (Abbildung 1).



**Abbildung 1: Elektronenmikroskopische Aufnahme eines Ultradünnschnittes der Kontaktstelle zwischen *Ignicoccus hospitalis* und *Nanoarchaeum equitans* nach Kultivierung in Cellulosekapillaren, Hochdruckgefrierung und Gefriersubstitution in AOUH. I.ho. *Ignicoccus hospitalis*, CM Cytoplasmamembran, OM äußere Membran, Pp periplasmatischer Raum, PV periplasmatische Vesikel; N.eq. *Nanoarchaeum equitans*. weißer Pfeil: Kontaktstelle, schwarzer Pfeil: fibrilläre Struktur zwischen den Zellen. Balken 1 µm. Abbildung aus Jahn et al., 2008**

Mit Hilfe von Ultradünnschnitten und anhand dreidimensionaler Rekonstruktionen ganzer Zellen konnten unabhängig von der Gegenwart von *N. equitans* in diesem periplasmatischen Raum membranumschlossene Vesikel unterschiedlicher Form und Größe nachgewiesen werden (Abbildung 1 "PV"; Huber et al., 2000; Rachel et al., 2002; Paper et al., 2007; Junglas et al., 2008). Über die Funktion dieser Strukturen ist bislang nur sehr wenig bekannt. Elektronenmikroskopische Analysen von Ultradünnschnitten lassen im Anschluss an die Abschnürung der Vesikel von der Cytoplasmamembran eine gerichtete Fusion unterschiedlicher Vesikelformen miteinander bzw. mit der äußeren Membran vermuten (Näther und Rachel, 2004). Dabei sind sie sowohl in Form (rund bis länglich) als auch Kontraststärke zu unterscheiden, was Rückschlüsse auf eine ungleiche Befüllung der Vesikel zulässt. Nachdem diese Strukturen in allen bisher beschriebenen Vertretern der Gattung *Ignicoccus* nachgewiesen werden konnten, tragen sie vermutlich zu der Versorgung der äußeren Membran über den ungewöhnlich weiten periplasmatischen Raum bei (Rachel et al., 2002; Junglas et al., 2008; Wasserburger, 2008).

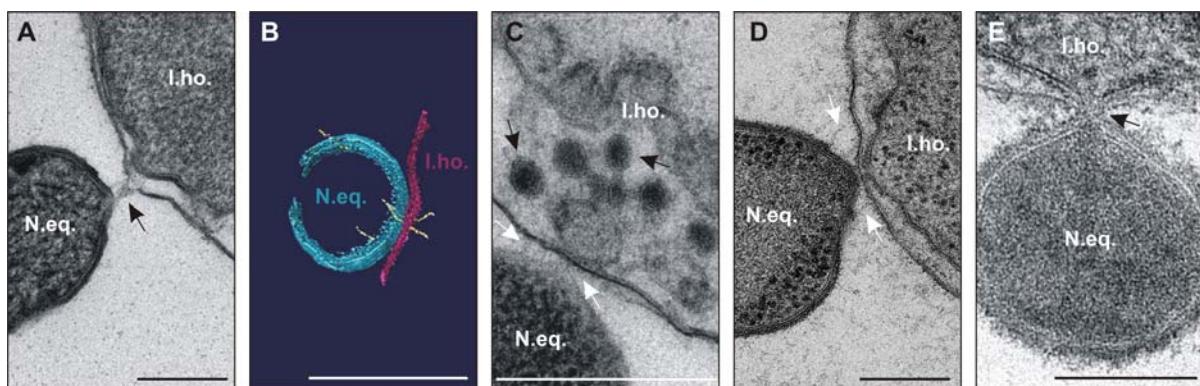
Das ebenfalls kokkoide Archaeum *N. equitans* ist mit einem Durchmesser von 0,35 bis 0,5 µm deutlich kleiner als *Ignicoccus* (Huber *et al.*, 2002) und zeigt mit einem glycosylierten Protein-S-Layer und einer darunter befindlichen Cytoplasmamembran einen typischen archaeellen Zellwandaufbau. Mit einer Größe von etwa 490 kbp weist *N. equitans* das kleinste bekannte archaeelle und eines der kleinsten Genome überhaupt auf (Huber *et al.*, 2002; Waters *et al.*, 2003). Sowohl die geringe Zellgröße als auch das stark reduzierte Genom von *N. equitans* sind Belege der symbiotischen bzw. parasitären Lebensweise dieses Archaeums, welches einzeln oder in Zahlen von bis zu zehn Zellen auf der Oberfläche von *I. hospitalis* nachgewiesen werden konnte (Ochman und Moran, 2001; Huber *et al.*, 2002; Waters *et al.*, 2003, Paper *et al.*, 2007). Die Ergebnisse einer vollständigen Genomsequenzierung durch die Firma DIVERSA Inc. (San Diego, CA, USA) deuteten im Falle von *N. equitans* auf ein stark reduziertes Genom hin und unterstrichen damit diesen Punkt. Sämtliche 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, fehlen im Genom von *N. equitans*. Zudem konnten nahezu keine Gene für Enzyme der bisher bekannten essentiellen Lipid-, Aminosäuren-, Cofaktor- und Nukleotid-Synthesewege nachgewiesen werden (Waters *et al.*, 2003). Nachdem es bisher nicht gelungen ist, *N. equitans* autonom in Reinkultur zu züchten, lassen diese gravierenden genomischen Defizite des Organismus den Schluss zu, dass die Spezies die erforderlichen Metabolite von dem Wirtsorganismus *I. hospitalis* bezieht. Versuche, *I. hospitalis* als Wirt durch einen der beiden anderen beschriebenen Vertreter der Gattung *Ignicoccus* bzw. durch weiter entfernt verwandte Spezies zu ersetzen, schlugen fehl (Jahn, 2003; Paper, 2005; Paper *et al.*, 2007). Damit stellt sich die Frage nach einem möglichen Metabolitaustausch zwischen den Spezies der Co-Kultur und den, in diesem Fall an der Versorgung von *N. equitans* durch seinen Wirt *I. hospitalis* beteiligten Strukturen.

## 2 Modelle der Interaktion zwischen *I. hospitalis* und *N. equitans*

Erste Belege für einen Austausch zwischen *I. hospitalis* und *N. equitans* lieferte eine vergleichende Analyse der Lipidzusammensetzung der Cytoplasmamembranen beider Spezies. So konnte gezeigt werden, dass die Struktur dieser Membranen sowohl in Bezug auf die Lipidzusammensetzung als auch bezüglich der Glykosylierungsmuster nahezu identisch ist. Nachdem *N. equitans* aufgrund seines reduzierten Genoms nicht zu einer autonomen Biosynthese von Lipiden befähigt ist, deutet dieser Befund darauf hin, dass der Organismus diese von *I. hospitalis* übernimmt. Zwar ist nicht abschließend geklärt, auf welche Weise dieser Transfer stattfindet, jedoch ist in diesem Zusammenhang ein Austausch über Membranfusionsprozesse denkbar (Jahn *et al.*, 2004). Mit Hilfe von vergleichenden <sup>13</sup>C-

Langzeitmarkierungsstudien an der Co-Kultur konnte zudem der Nachweis erbracht werden, dass *N. equitans* Aminosäuren von seinem Wirt bezieht (Gallenberger 2008; Jahn *et al.*, 2008). In welcher Form dieser Austausch stattfindet und welche Strukturen daran beteiligt sind, ist bislang ungeklärt.

Wie bereits erwähnt, kommt es im Rahmen der Lebensgemeinschaft zwischen *I. hospitalis* und *N. equitans* zur Ausbildung eines direkten Zell-Zell-Kontaktes. Jüngste elektronenmikroskopische Studien deuten dabei auf einen mehrstufigen Prozess der Annäherung und Kontaktaufnahme zwischen den Zellen hin (Abbildung 2; Junglas *et al.*, 2008; Wasserburger, 2008).



**Abbildung 2: Elektronenmikroskopische Aufnahmen und 3D-Visualisierung der Phasen der Kontaktaufnahme und des Austausches zwischen *Ignicoccus hospitalis* und *Nanoarchaeum equitans*.** I.ho. *Ignicoccus hospitalis*, N.eq. *Nanoarchaeum equitans*. Phase 1: Kontaktaufnahme über extrazelluläre Strukturen (A, B); Phase 2: indirekter Austausch über Vesikel (C) und Membranen (D); Phase 3: direkter Austausch durch Verschmelzung der Cytoplasmamembranen (E); Präparationstechniken: (A, C - E) Kultivierung in Cellulosekapillaren, Hochdruckgefrierung und Gefriersubstitution der Zellen, (B) Elektronen-Cryotomographie intakter, hydratisierter Zellen und 3D Rekonstruktion mit AMIRA™ (rot: Oberfläche von *I. hospitalis*, blau: Zellhülle von *N. equitans*). Pfeile siehe Text; Balken 0,5 µm. Abbildungen aus Junglas *et al.*, 2008 (A, B und D) und Wasserburger, 2008 (C und E)

Nach gegenwärtigem Wissensstand ist dieser Prozess in drei Phasen zu unterteilen, wobei die Annäherung der Zellen und die Kontaktaufnahme über extrazelluläre Strukturen als Anfangsstadium gelten. Diese Annahme basiert auf den Resultaten zweier unabhängiger, strukturerhaltender, elektronenmikroskopischer Analysen, welche sich bezüglich der Präparationsmethode deutlich unterscheiden. So konnten sowohl durch Kultivierung in Cellulosekapillaren, Hochdruckgefrierung, Gefriersubstitution und anschließender Ultradünnsschnittstudien bei Raumtemperatur als auch durch Elektronen-Cryotomographie von intakten Zellen fibrilläre Strukturen im Bereich der Kontaktstelle nachgewiesen werden, welche beide Zellen miteinander verbinden (Abbildung 2; Pfeil in A, gelbe Strukturen in B; Junglas *et al.*, 2008). Aufwuchs- und Anheftversuche mit *I. hospitalis* lassen zudem eine adhäsive Funktion der Zellanhänge der Spezies vermuten (Müller, 2005). Derartige Strukturen sind ebenfalls für *N. equitans* postuliert. Eine funktionelle Beschreibung ist jedoch aufgrund einer fehlenden

Reinkultur für diesem Stamm deutlich erschwert (Huber *et al.*, 2003; Jahn *et al.*, 2008). Des Weiteren könnten Glykosylierungen auf der Oberfläche beider Organismen zu einem Kontakt beitragen, welche im Falle des S-Layer-Proteins von *N. equitans* bereits nachgewiesen werden konnten (Schuster, 2003).

In der darauf folgenden zweiten Phase des Zell-Zell-Kontaktes bildet sich zwischen den beiden Spezies eine unmittelbare Verbindung über die exponierten Zellhüllstrukturen aus. Mit dem Erreichen dieser Kontaktphase beginnt vermutlich der Austausch von Metaboliten zwischen den Zellen. Dabei lassen sich in Abhängigkeit von der Lage der Kontaktstelle auf der Oberfläche von *I. hospitalis* wiederum zwei verschiedene Modelle des Austausches unterscheiden. Zum einen ließen elektronenmikroskopische Analysen an Ultradünnschnitten einen zielgerichteten Transport auffällig stark kontrastierter Vesikel vom Cytoplasma durch den periplasmatischen Raum in den Bereich der Kontaktstelle zu *N. equitans* vermuten (Abbildung 2C, schwarze Pfeile). Zum anderen deutete im Falle der in Abbildung 2D dargestellten Variante eine signifikante Annäherung der Cytoplasmamembran von *I. hospitalis* an dessen äußere Membran im Bereich der Kontaktstelle mit *N. equitans* auf einen direkten Austausch über die genannten Membranen ohne Vesikelbeteiligung hin. Dieses zweite Modell ist in den Analysen weit häufiger anzutreffen und galt bis vor kurzem als einziges Austauschmodell für die Interaktion zwischen *I. hospitalis* und *N. equitans* (Rachel *et al.*, 2002). Wie den Abbildung 2C und 2D zu entnehmen ist, bleiben die bereits genannten extrazellulären, fibrillären Verbindungen im Verlauf dieser Interaktionsphase bestehen (weiße Pfeile).

Die abschließende dritte Phase des Zell-Zell-Kontaktes führt zu einer direkten Verbindung der Cytoplasmamembranen beider Zellen und ist verbunden mit einer partiellen Auflösung des S-Layers von *N. equitans* (Abbildung 2E, schwarz Pfeil). Die Membranen beider Organismen scheinen im Verlauf dieser Phase miteinander zu verschmelzen, was zur einseitigen Auflösung des Cytoplasmas und so zur Lyse der *Ignicoccus*-Zelle führt und mit dem Sterben des Wirtsorganismus endet. Die elektronenmikroskopischen Daten bezüglich dieses dritten Stadiums sind zwar spärlich, zeigen jedoch in einem einheitlichen Bild, dass von dieser Lyse lediglich der Wirt betroffen ist (Wasserburger, 2008). Dieser Befund stützt die Theorie einer parasitären Beziehung zwischen *N. equitans* und *I. hospitalis* zu Gunsten von *N. equitans*. Basierend auf der Biosyntheseleistung des Wirtes steht an deren Ende das Absterben von *I. hospitalis*, was eine mögliche Erklärung für das häufige Auftreten "freischwimmender" *N. equitans*-Zellen in der späten exponentiellen Wachstumsphase der Co-Kultur ist (Junglas *et al.*, 2008; Wasserburger, 2008).

### 3 Aspekte der Zellhüllstrukturen von *I. hospitalis* und *N. equitans*

Für die Untersuchung der Vorgänge im Verlauf der Kontaktaufnahme und des Austausches zwischen den Zellen ist eine Charakterisierung der Zellhüllstrukturen von *I. hospitalis* und *N. equitans* von besonderem Interesse. Infolge der labilen Zellhülle des Wirtsorganismus, bedingt durch das Fehlen stabilisierender Zellwandpolymere und aufgrund der geringen Zellgröße von *N. equitans*, ist eine ultrastrukturelle Analyse zur Klärung dieser Fragestellung erheblich erschwert. Deshalb wurde eine zusätzliche proteinbiochemische Untersuchung der an der Kontaktstelle beteiligten Zellhüllstrukturen angestrebt.

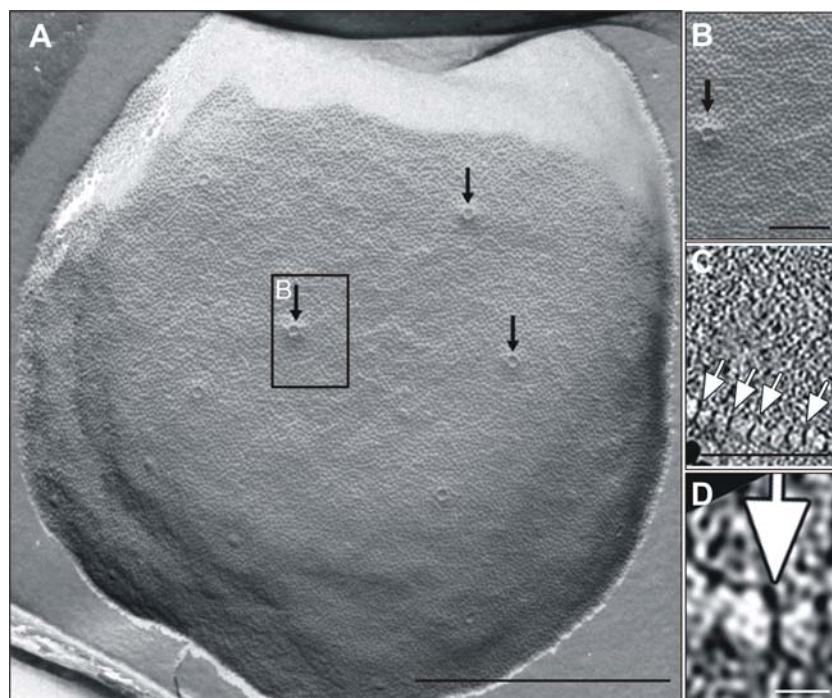
So konnte mit Hilfe von elektronenmikroskopischen Analysen für den S-Layer von *N. equitans* anhand von Gefrierätzpräparaten eine hexagonale Symmetrie mit einem Abstand zwischen den Protein-Untereinheiten der Struktur von 16 nm bestimmt werden. Diese Messdaten sind artspezifisch und können damit unter anderem einer Identifikation der Spezies in elektronenmikroskopischen Präparaten dienen. Das entsprechende S-Layer-Protein wurde bereits massenspektrometrisch identifiziert und bioinformatisch analysiert. Es handelt sich um das 100 kDa große Protein NEQ300, welches in seiner nativen Form glykosyliert vorliegt. Durch immunzytologische Untersuchungen konnte die Lokalisation des Proteins auf der Zelloberfläche von *N. equitans* bestätigt werden (Schuster, 2003; Gürster, 2007, Wasserburger, 2008). Des Weiteren wurde das vermeintliche *Linker*-Protein NEQ236 identifiziert, welches für die Verankerung des S-Layers in der Cytoplasmamembran verantwortlich ist. Dieses Protein erstreckt sich in Form von Homooligomeren von der Cytoplasmamembran bis hin zum S-Layer, wo es mit NEQ300 interagiert und spannt auf diese Weise einen 20 nm breiten periplasmatischen Spalt in der Zellhülle von *N. equitans* auf (Gürster, 2007).

In Bezug auf die Interaktion zwischen *N. equitans* und dessen Wirtsorganismus *I. hospitalis* wird neben dem S-Layer auch der äußeren Membran von *I. hospitalis* eine zentrale Funktion zugeschrieben. Dabei handelt es sich um einen Bilayer, welcher aufgrund von signifikanten Kontrastunterschieden zwischen dem äußeren und inneren Blatt als asymmetrisch beschrieben wurde (Rachel *et al.*, 2002; Näther und Rachel, 2004). Aufgrund der Lipid- und Protein Zusammensetzung und -biosynthese ist diese äußere Membran jedoch deutlich von der äußeren Membran Gram-negativer Bakterien zu unterscheiden und repräsentiert damit einen neuartigen Zellwandtyp (De Rosa und Gambacorta, 1986; Lange *et al.*, 2000; Rachel *et al.*, 2002; Nikaido, 2003).

Wie durch gas- und flüssigkeitschromatographische Analysen nachgewiesen wurde, ist die Membranlipidkonstitution bereits innerhalb der *Ignicoccus*-Zelle uneinheitlich. Die äußere und die Cytoplasmamembran von *I. hospitalis* zeigen eine einfache Lipidzusammensetzung aus Glyzerin-Diphytan-Diether- (Archaeol) und Glyzerin-Dibiphytan-Glyzerin-Tetraetherlipiden (Caldarchaeol), welche sowohl glykosyliert (mit Mannose- oder Glukoseresten) als

auch phosphoryliert vorliegen können. Während die Cytoplasmamembran neben Archaeol (90%) auch einen signifikanten Anteil des membrandurchspannenden Caldarchaeols (10%) enthält und damit einen partiellen Monolayer-Charakter zeigt, ist die äußere Membran ausschließlich aus Archaeol aufgebaut (Jahn *et al.*, 2004).

Einige wesentliche ultrastrukturelle Aspekte der äußeren Membran sind in Abbildung 3 dargestellt. Das in 3A abgebildete Gefrierätzpräparat zeigt das äußere Blatt der äußeren Membran von innen und macht den einfachen strukturellen Aufbau dieser Zellhüllschicht deutlich. So sind mit dieser Methode zwei, in ihren Dimensionen und der Häufigkeit ihres Auftretens verschiedenartige Proteinkomplexe in der Membran nachweisbar. Dabei handelt es sich zum einen um Komplexe mit einem Gesamtdurchmesser von 24 nm, welche je nach Zellgröße in 10 bis 100 Kopien in der Membran einer Zelle auftreten (Pfeile in A und B) und zum anderen um eine kleinere, porenanformende Struktur mit einem Durchmesser von 7 nm, welche, verteilt über die gesamte Membran, in quasikristalliner Form auftritt (Abbildung 3B, C und D; Rachel *et al.*, 2002; Näther und Rachel, 2004; Burghardt *et al.*, 2007).



**Abbildung 3: Ultrastrukturelle Aspekte der äußeren Membran von *Ignicoccus hospitalis*.** Elektronenmikroskopische Aufnahmen und tomographische Rekonstruktion der äußeren Membran von *I. hospitalis*. (A) Gefrierätzung der äußeren Membran mit Blick auf das innere Blatt von der periplasmatischen Seite; (B) Detailansicht einer charakteristischen Region der äußeren Membran bei doppelter Vergrößerung, 24 nm Komplex (Pfeil) in einer Matrix aus 7 nm-Partikel; (C) Tomographische Rekonstruktion eines negativ kontrastierten Fragmentes der äußeren Membran mit Blick auf die vertikale Schnittebene durch die Membran; weiße Pfeile markieren die Poren mehrerer 7-nm-Partikel; (D) Detailansicht einer 7 nm-Pore. Balken in (A) 0,5 µm, in (B und C) 0,05 µm, in (D) 0,01 µm. Abbildungen aus Rachel *et al.*, 2002 (A, B) und Burghardt *et al.*, 2007 (C, D)

Anhand einer tomographischen Rekonstruktion von negativ kontrastierten Fragmenten der äußeren Membran konnte für diese sogenannten 7 nm-Partikel sowohl der Durchmesser der zentralen Pore (2 nm) als auch eine transmembrane Topographie bestimmt werden (weiße Pfeile in Abbildung 3C und D; Burghardt *et al.*, 2007).

#### 4 Die dominierende Proteinspezies der äußeren Membran von *I. hospitalis*, Ihomp1

Proteinbiochemische Analysen aufgereinigter Fraktionen der äußeren Membran von *I. hospitalis* wiesen, entsprechend des zahlreichen Auftretens der 7 nm-Partikel, auch eine dominierende Proteinspezies in der Membran auf. Auf Grundlage der seit September 2007 in einer überarbeiteten Version zur Verfügung stehenden Genomdaten des Wirtsorganismus konnte dieses Protein als Produkt des Genes *igni\_1266* identifiziert werden. Es handelt sich um ein 8,39 kDa großes Membranprotein, welches zunächst auf Grund der Masse des prozessierten Proteins von 6,23 kDa als Imp6 bezeichnet wurde (*Ignicoccus outer membrane protein, 6 kDa*; Burghardt, 2005). Die Protein-Nomenklatur wurde entsprechend einer früheren Genomversion vorübergehend in Imp1227 geändert, bevor mit der Bezeichnung Ihomp1 (*Ignicoccus hospitalis outer membrane protein 1*) eine allgemeingültige, unabhängige Terminologie eingeführt wurde (Burghardt *et al.*, 2007 und 2008). Eine N-terminale Sequenzierung und vorläufige Primärstrukturanalyse deutete sowohl auf eine Signalsequenz als auch auf eine mutmaßliche α-helikale Transmembrandomäne hin, welche für die Translokation und Verankerung des Proteins in der Membran verantwortlich sein könnten. Ein derartiges Sekundärstrukturmotiv ist im Vergleich zu den bekannten Membranproteinen der äußeren Membran Gram-negativer Bakterien, welche die Membran in der Regel in Form von β-Faltblattstrukturen durchspannen, ungewöhnlich (Schirmer, 1998; Koebnik *et al.*, 2000; Zeth *et al.*, 2000; Burghardt *et al.*, 2007). Wie durch umfangreiche Denaturierungsstudien gezeigt werden konnte, bildet Ihomp1 stabile Homooligomere von 45 und 50 kDa aus, welche eine strukturgebende Funktion im Zusammenhang mit den dominierenden 7 nm-Partikeln der äußeren Membran einnehmen könnten. Vorläufige vergleichende Analysen bezüglich der Protein Zusammensetzung der äußeren Membranen von *I. hospitalis*, *I. islandicus* und *I. pacificus* mittels 2D-SDS-PAGE deuteten auf signifikante Unterschiede insbesondere in Bezug auf das Auftreten von Ihomp1 hin, welches auf Grundlage seines charakteristischen, temperaturabhängigen Oligomerisierungsverhaltens lediglich im Falle von *I. hospitalis* nachweisbar war (Burghardt, 2005). Somit ist eine Beteiligung dieses, demnach mutmaßlich wirtsspezifischen Proteins an der Interaktion mit *N. equitans* denkbar, weshalb eine weiterführende Charakterisierung dieses Membranproteins angestrebt wurde.

## 5 Zielstellung

Ziel dieser Arbeit war es, weitere Einblicke in den Vorgang der Interaktion zwischen *I. hospitalis* und *N. equitans* zu gewinnen. Dabei wurde der äußeren Membran des Wirtsorganismus in Anlehnung an die in Abbildung 2D beschriebenen Modelle eines Stoffaustausches über die Membranen der beiden Organismen der Co-Kultur eine entscheidende Rolle zugeschrieben. Vor dem Hintergrund, dass weder *I. islandicus* noch *I. pacificus* als Wirtsorganismus für *N. equitans* dienen können, sollte die Membran von *I.hospitalis* isoliert und auf ihre Proteinzusammensetzung untersucht werden.

Dabei stand das dominierende Membranprotein Ihomp1 aus *I. hospitalis* im Fokus der vorliegenden Arbeit. Mit Hilfe ausgedehnter Immunlokalisationsstudien sollte sowohl die Lokalisation des Proteins in der Zelle als auch die Verbreitung innerhalb der Gattung *Ignicoccus* bestimmt werden. Zudem sollten die durch Ihomp1 ausgebildeten homooligomeren 45 und 50 kDa-Komplexe in ihrer Struktur und physiologischen Funktion biochemisch sowie biophysikalisch charakterisiert werden.

Im Rahmen einer massenspektrometrischen Erfassung und Identifikation der Membranproteine der Rein- und Co-Kultur sollten weitere, potenziell am Aufbau der Kontaktstelle zwischen *I. hospitalis* und *N. equitans* beteiligte Proteinspezies bestimmt werden.

## II Material und Methoden

### 1 Substanzen und Bezugsquellen

#### 1.1 Chemikalien

Substanz	Hersteller
Acrylamid-Bisacrylamid-Fertiglösungen (37,5:1)	Roth, Karlsruhe
Agarose	Biozym, Oldendorf
Ammoniumpersulfat	Serva, Heidelberg
BPB	Serva, Heidelberg
BSA; Fraktion V	Sigma, St. Louis (USA)
Dithiothreitol	Sigma, Steinheim
n-Dodecyl-beta-D-maltopyranosid, Anagrade	Anatrace, Maumee (USA)
Ethanol; p.a.	Baker, Deventer (NL)
Ethidiumbromid	Roth, Karlsruhe
Gelatine	Sigma, Steinheim
Glycerin	Fluka, Buchs (CH)
Kaliumdihydrogenphosphat	Riedel de Haën, Seelze
MES	Sigma, Steinheim
MOPS	Roth, Karlsruhe
Na2EDAT	Sigma, Steinheim
Natriumdisulfit	Sigma, Steinheim
Natriumhydrogencarbonat	Sigma, Steinheim
Phenol und Phenolgemische	MP Biomedicals, Illkirch (F)
PMSF	Roth, Karlsruhe
2-Propanol; p.a.	Acros, New Jersey (USA)
Resazurin	Serva, Heidelberg
Schwefel	Riedel de Haën, Seelze
SDS	Serva, Heidelberg
Silbernitrat	Roth, Karlsruhe
TEMED	Sigma, St. Louis (USA)
Tricin; p.a.	Roth, Karlsruhe
Tris; p.a.	USB, Cleveland (USA)
Uranylacetat	Fluka, Buchs (CH)

Alle weiteren Substanzen wurden von der Firma Merck, Darmstadt in p.a. Qualität bezogen.

Alle für die Kultivierung benötigten Gase stammten von der Firma Linde Gas, Nürnberg.

## 1.2 Molekularmassenstandards

Protein-Massenstandard	Hersteller
PageRuler™ Unstained Protein Ladder; SM0661	Fermentas, St.Leon-Rot
PageRuler™ Prestained Protein Ladder; SM0671	Fermentas, St.Leon-Rot

DNA-Längenstandard	Hersteller
1kb DNA Ladder; N3232	New England Biolabs, Frankfurt am Main
100bp DNA Ladder; N3231	New England Biolabs, Frankfurt am Main

## 1.3 Enzyme/kommerzielle Puffer

Enzym/kommerzieller Puffer	Hersteller
dNTP-Mix; NTPMX100, each 10mM	Qbiogene, Heidelberg
Phusion DNA Polymerase (2U/µl); F530	Finnzymes, Espoo (FIN)
5x Phusion Reaktionspuffer; F518	Finnzymes, Espoo (FIN)
Proteinase K	Roth, Karlsruhe
RNase A	Serva, Heidelberg
Trypsin	Roche, Mannheim

## 1.4 Antikörper

Primärer Antikörper	Hersteller
rabbit anti-Ihomp1	Davids Biotechnologie, Burgweinting
Sekundärer Antikörper	Hersteller
goat anti-rabbit IgG + 6nm Gold	Aurion, Wageningen (NL)
goat anti-rabbit IgG + alkalische Phosphatase	Sigma, Taufkirchen

## 1.5 Organismen

Kultur	Stamm	Kulturensammlung	Herkunft	Literatur
Reinkulturen:				
<i>Ignicoccus hospitalis</i>	KIN4/I	BBR 17/12/4	Kolbeinsey-Rücken	Parker <i>et al.</i> , 2007
<i>Ignicoccus islandicus</i>	KOL8	BBR 17/10/1	Kolbeinsey-Rücken	Huber <i>et al.</i> , 2000
<i>Ignicoccus pacificus</i>	LPC33	BBR 17/102	pazifischer Graben	Huber <i>et al.</i> , 2000
Co-Kultur:				
<i>Ignicoccus hospitalis</i> und <i>Nanoarchaeum equitans</i>	KIN4/M	BBR 17/10/4	Kolbeinsey-Rücken	Huber <i>et al.</i> , 2002

## 2 Kulturmedien

Alle *Ignicoccus*-Kulturen sowie die Co-Kultur aus *Ignicoccus hospitalis* und *Nanoarchaeum equitans* wurden unter strikt anaeroben Bedingungen in  $\frac{1}{2}$  SME Medium (nach Stetter *et al.*, 1983, Pley *et al.*, 1991, modifiziert nach Huber *et al.*, 2003) kultiviert.

### 2.1 Zusammensetzung des $\frac{1}{2}$ SME Kulturmediums

Substanz	Menge/Liter
NaCl	13,85 g
MgSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O	3,5 g
MgCl <sub>2</sub> x 6 H <sub>2</sub> O	2,75 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,5 g
CaCl <sub>2</sub> x 2 H <sub>2</sub> O	0,38 g
KCl	0,33 g
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0,25 g
NaBr	0,05 g
H <sub>2</sub> BO <sub>3</sub>	15 mg
NaHCO <sub>3</sub>	0,16 g
SrCl <sub>2</sub> x 6 H <sub>2</sub> O	7,5 mg
KJ	50 µg
H <sub>2</sub> O <sub>millipore</sub>	ad 1000 ml

Dem Medium wurden zusätzlich 10 g elementarer Schwefel zugegeben. Der pH-Wert wurde mit  $\text{H}_2\text{SO}_4$  (50 %, v/v in  $\text{H}_2\text{O}_{\text{millipore}}$ ) auf 5,5 eingestellt und als Gasphase ein  $\text{H}_2/\text{CO}_2$ -Gas-Gemisch (80:20, v/v) mit einem Druck von 2 bar aufgepresst.

## 2.2 Herstellung der Kulturmedien

### 2.2.1 Kleinmaßstab – 20 ml Serumflaschen

Nachdem die Salze des Kulturmediums in ca. 800 ml  $\text{H}_2\text{O}_{\text{millipore}}$  gelöst und der Schwefel mit Hilfe eines Ultra-Turrax (T25, IKA Labortechnik, Staufen im Breisgau) homogenisiert wurde (10 Min., 10000 UPM), konnte nach Zugabe der Kaliumjodid-Lösung sowie 1 mg des Redoxindikators Resazurin mit  $\text{H}_2\text{O}_{\text{millipore}}$  auf 1000 ml aufgefüllt werden.

Um den anoxischen Ansprüchen der Organismen an das Medium gerecht zu werden, wurde der Sauerstoff so weit wie möglich ausgetrieben (Durchgasung: 30 Min. unter Druckausgleich mit  $\text{N}_2/\text{CO}_2$  (80:20; v/v)) und etwaige Rückstände durch Zugabe von 0,5 g  $\text{Na}_2\text{S}$  reduziert.

Nachdem der pH-Wert kontrolliert und mit Hilfe von 50%iger  $\text{H}_2\text{SO}_4$  (v/v in  $\text{H}_2\text{O}_{\text{millipore}}$ ) auf 5,5 bis 6 eingestellt wurde, konnte das Medium in der Anaerobenammer (Coy Laboratory Products Inc., Grass Lake Michigan, USA) zu je 20 ml auf Kulturflaschen (Natronkalk-Silikat-Glas, Stute GmbH, Rheinbreitbach) aufgeteilt werden. Vor dem Ausschleusen wurden die Flaschen mit Gummistopfen (DIN 12871, Laborcenter Nürnberg) und Aluminiumringen (Bellco Glass, New Jersey, USA) luftdicht verschlossen. Abschließend erfolgte der Austausch des Kammergases ( $\text{N}_2/\text{H}_2$  95:5 v/v) gegen ein Gemisch von  $\text{H}_2/\text{CO}_2$  80:20 (v/v) an der Gasstation. Dazu wurden die Flaschen jeweils dreimal evakuiert und 2 bar des gewünschten Gasgemisches aufgepresst.

### 2.2.2 Großmaßstab – Vorkulturen und Fermenter

#### Fermenter-Vorkulturen

Die Medienherstellung für Fermenter-Vorkulturen erfolgte analog der in Kap. II. 2.2.1 beschriebenen Vorgehensweise. Nach dem Auffüllen auf 1000 ml wurde das Medium in die Kammer überführt und zu gleichen Teilen auf vier Druckgasflaschen verteilt, diese mit Gummistopfen und Schraubkappen verschlossen und nach dem Ausschleusen für 30 Min. unter Druckausgleich mit einem Gasgemisch aus  $\text{N}_2/\text{CO}_2$  80:20 (v/v) durchgast. Die Reduktion des verbliebenen Sauerstoffs, die Korrektur des pH-Wertes sowie der Gasphase und die abschließende Sterilisation erfolgten wie beschrieben (siehe Kap. II. 2.2.1 und 3). Der Druck der  $\text{H}_2/\text{CO}_2$  80:20 (v/v) Gasphase wurde im Falle der Fermenter-Vorkulturen auf 0,8 bar Überdruck pro 1000 ml Flasche eingestellt.

## Fermenter

Alle Bestandteile des  $\frac{1}{2}$  SME Mediums, mit Ausnahme von Schwefel,  $\text{Na}_2\text{S}$  und  $\text{H}_2\text{SO}_4$ , wurden im Fermenter unter Rühren in  $\text{H}_2\text{O}_{\text{millipore}}$  gelöst und für 40 Min. bei 121 °C autoklaviert. Der Schwefel wurde in einem geringen Volumen  $\text{H}_2\text{O}_{\text{millipore}}$  aufgenommen und mit Hilfe eines Ultra-Turrax (T50, IKA Labortechnik, Staufen im Breisgau) homogenisiert. Der erhaltene Schwefelbrei wurde für 1 h bei 110 °C tyndallisiert. Schwefelsäure (25 %, v/v in  $\text{H}_2\text{O}_{\text{millipore}}$ ) und Natriumsulfidlösung (50 g in ca. 150 ml  $\text{H}_2\text{O}_{\text{millipore}}$ ) wurden in separaten Schottflaschen bereitgestellt und ebenfalls autoklaviert (20 Min., 121 °C).

Die Zusammenführung der Medienbestandteile erfolgte direkt vor dem Animpfen des Fermenters. Dazu wurden nacheinander Schwefel, Natriumsulfid sowie eine gut gewachsene Fermenter-Vorkultur ( $1 \times 10^5$  Zellen/ml) in den Fermenter gegeben. Abschließend wurde der pH-Wert mit 50%iger  $\text{H}_2\text{SO}_4$  eingestellt und der Fermenter für die Kultivierung verschlossen.

## **3 Sterilisation**

Nicht schwefelhaltige Medien sowie hitzeunempfindliche Puffer und Lösungen wurden unter feuchter Hitze und 2 bar für 20 Min. bei 121 °C autoklaviert (Sanoclav, LAM-20L, Bad Überkingen). Das schwefelhaltige  $\frac{1}{2}$  SME Medium wurde für 60 Min. bei 110 °C unter feuchter Hitze inkubiert. Pipettenspitzen, Eppendorf-Reaktionsgefäß (ERG), Spritzen und Glaswaren wurden für 40 Min. bei 121 °C autoklaviert.

## **4 Kultivierung und Ernte**

### **4.1 Kultivierung im Kleinmaßstab**

Für das Animpfen der Medien wurden 0,2 ml einer logarithmisch wachsenden Kultur steril und langsam durch den die Flasche verschließenden Gummistopfen direkt in das Medium gespritzt. Die Kultivierung erfolgte bei 90 °C liegend und unter Schütteln bei ca. 50 UPM im Heißluftinkubator (T5090, Heraeus, Kendro® Laboratory Products GmbH, Langenselbold). Da ein Abkühlen der wachsenden Kultur das Wachstumsverhalten der Zellen stören würde, wurden entsprechende Kontrollproben direkt und zügig am Inkubator entnommen. In der Regel konnten so bereits nach 16- bis 18-stündiger Inkubation Zelldichten von bis zu  $1 \times 10^7$  Zellen pro Milliliter erzielt werden.

### **4.2 Kultivierung im Großmaßstab**

Für die Kultivierung im Großmaßstab wurden die Vorkulturmedien (siehe Kap. II. 2.2.2) analog zu Kap. II. 4.1 durch steriles Zuspritzen von jeweils 2 ml einer logarithmisch wachsenden Kultur angeimpft und liegend unter Schütteln bei 90 °C inkubiert. Mit Erreichen

einer Zelldichte von  $1 \times 10^5$  Zellen pro ml waren die Vorkulturen für eine Beimpfung der Fermenter geeignet. Für die Kultivierung im Großmaßstab wurden Vorkulturen eingesetzt, welche sich in der logarithmischen Wachstumsphase befanden und deren pH-Wert mit steriler 50%iger H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> auf 5,5 bis 6,0 eingestellt wurde. Hefeextrakt (0,1 % w/v in H<sub>2</sub>O<sub>Millipore</sub>; Verwendung nur im Falle der Kultivierung im Großmaßstab), Na<sub>2</sub>S sowie Schwefel wurden kurz vor dem Animpfen des Fermenters gemeinsam mit den Vorkulturen in den Fermenter gegeben. Die Inkubation erfolgte anschließend bei 90 °C unter Röhren (100 UPM) in einer H<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub> 80:20 (v/v) Gasphase (2 bar Überdruck). Um das Stoffwechselendprodukt H<sub>2</sub>S, welches als Wachstumsinhibitor auf die Zellen wirkt, auszutreiben, wurde der Fermenter (100 l) ab einer Zellzahl von  $5 \times 10^6$  Zellen/ml zusätzlich mit 30 Liter pro Min. N<sub>2</sub>/H<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub> (65:15:20; v/v/v) durchgast.

#### 4.3 Zellernte

Mit dem Erreichen einer konstanten Zellzahl wurden die Zellen aus dem Fermenter geerntet. Hierzu wurde die Temperatur auf 4 °C herabgesetzt und die Rührung gestoppt. Im Falle der Kultivierung in einem 300 Liter Fermenter wurden die Zellen mit Hilfe einer Durchlaufzentrifuge (TYP CEPA Z41G, Padberg, Lahr) aufkonzentriert. Für eine dauerhafte Lagerung der Zellen wurden diese direkt von der im Rotor befindlichen Teflonfolie in flüssigem Stickstoff überführt, schockgefroren und bei -80 °C aufbewahrt.

Die Zellernte der Co-Kultur weicht dabei durch einen zusätzlichen Zentrifugationsschritt (40 Min., 4300 UPM, 4 °C, Jouan KR 422-Zentrifuge; Jouan, Saint Herblain Cedex, F) von dem Standardprotokoll ab, wodurch freischwimmende *Nanoarchaeen* von den massigeren *Ignicoccus*-Zellen und den zahlreich daran anhaftenden *Nanoarchaeen* abgetrennt werden sollten.

### 5 Isolation der Zellbestandteile

#### 5.1 Zellaufschluss

<u>hypotoner Puffer</u>	Na <sub>2</sub> EDTA	1,0 mM
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	5,0 mM
	Mg <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O	1,4 mM
	PMSF	1,0 mM
pH 4,4 - ergibt sich		

Maximal 0,5 g Zellmasse wurden pro Milliliter hypotonem Puffer resuspendiert, anschließend für 15 Min. in einem Eisbad gelagert und in einen 50 ml Glas-Teflon-Homogenisator (Braun, Melsungen) überführt. Der Zellaufschluss erfolgte durch mechanische Scherung (20 Striche

mittels Teflonstößel in Kombination mit einem IKA Rührwerk (unter  $V_{Max}$  bei RT; Typ: RW 14H, IKA, Staufen). Der Zustand der Zellen wurde vor und nach der Behandlung lichtmikroskopisch kontrolliert und die Prozedur gegebenenfalls wiederholt. Während der Kontrollen wurde die Suspension auf Eis gelagert. Das so erhaltene Zellhomogenat konnte anschließend bei -80 °C aufbewahrt werden.

## 5.2 Dichtegradienten-Zentrifugation

<u>MOPS-Puffer</u>	NaCl	50 mM
	MOPS/NaOH pH 7,2	25 mM
	MgCl <sub>2</sub> x 6 H <sub>2</sub> O	3 mM

Mit Hilfe eines Gradientenmixers (Eigenbau der Werkstatt) wurde ein kontinuierlicher Saccharosegradient in 12 ml Ultrazentrifugenrörchen (Beckman Ultra-Clear 3½ Zoll Zentrifugenrörchen; Beckman Coulter, Unterschleißheim) hergestellt. Dazu wurden jeweils 3,5 ml einer 70%igen (2 M Saccharose in MOPS-Puffer, w/v) und 3,5 ml einer 8,5%igen (0,25 M Saccharose in MOPS-Puffer, w/v) Saccharoselösung eingesetzt. Auf diese Art wurde ein vom Boden des UZ-Röhrchens nach oben hin abnehmender, kontinuierlicher Saccharosegradient erzeugt.

Zur Auftrennung der im Homogenat befindlichen Zellen, Zellfragmente und Zellbestandteile wurden 3 ml der aus dem Zellaufschluss gewonnenen Suspension pro Gradient aufgetragen und die so beladenen UZ-Röhrchen anschließend bei 4 °C für 3,5 h zentrifugiert (40500 UPM ≈ 207.000 x g; SW 41 Ti Rotor, Beckman Optima™ LE-80K Ultrazentrifuge, Beckman Coulter, Unterschleißheim).

## 5.3 Isolation und Dialyse der Fraktionen

Die Fraktionen der Dichtegradienten-Zentrifugation wurden durch seitliches Punktieren und Aufziehen in eine 1 ml Spritze gewonnen und bei 4 °C bzw. -80 °C aufbewahrt.

Der in den Fraktionen enthaltene Zucker wurde durch Dialyse gegen MOPS-Puffer (siehe Kap. II. 5.2) entfernt. Dazu wurden die Fraktionen in Dialyseschläuche (Typ 8/32, Porendurchmesser: 2,5 nm; Serva, Heidelberg) überführt und zweimal für je 1 h sowie einmal über Nacht dialysiert. Die Dialyseschläuche wurden im Vorfeld zunächst in Puffer I (100 mM NaHCO<sub>3</sub>, 1 mM EDTA) und anschließend in H<sub>2</sub>O<sub>millipore</sub> für jeweils 15 Min. aufgekocht und bis zur Verwendung in 70%igem Ethanol (v/v in H<sub>2</sub>O<sub>millipore</sub>) bei 4 °C gelagert.

## 6 Proteinbiochemische Methoden

### 6.1 Proteinkonzentrationsbestimmung

Für die Proteinkonzentrationsbestimmung wurde der "BCA™ Protein-Assay-Kit" der Firma Thermo Scientific (Rockford, USA) verwendet (Smith *et al.*, 1985; Wiechelman *et al.*, 1988). Der Test wurde nach Anleitung des Herstellers durchgeführt. Aliquots von jeweils 10 µl der zu untersuchenden Proteinlösungen und BSA-Eichlösungen bekannter Konzentration wurden mit 200 µl Gebrauchslösung (196 µl "BCA™ Reagent A" + 4 µl "BCA™ Reagent B") gemischt, für 30 Min. unter Schütteln bei 60 °C inkubiert und nach Abkühlen auf 37 °C bei 562 nm an einem ELISA Reader (Sunrise-Basic-TECAN, TECAN, Grödig (A)) photometrisch vermessen. Die Proteinkonzentrationen der Testproben wurden anhand der BSA-Eichgerade bestimmt.

### 6.2 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

#### 6.2.1 Herstellung der Gele

<u>Sammelpuffer</u>	Tris/HCl pH 6,8	0,5 M
<u>Trennpuffer</u>	Tris/HCl pH 8,8	1,5 M

Für die elektrophoretische Auftrennung denaturierter Proteinlösungen wurden mehrheitlich kontinuierliche SDS-Polyacrylamidgele mit 10%igen Trenngelen verwendet (Laemmli, 1970; modifiziert nach Schägger von Jagow, 1987). Nach etwa 30-minütiger Polymerisation des Trenngels wurde ein 4%iges Sammelgel überschichtet und ein entsprechender Gel-Kamm eingesetzt.

Substanz	4 % Sammelgel	10 % Trenngel
Acrylamid-Bisacrylamid-Lösung (37,5:1)	0,3 ml	2,0 ml
Sammel-/Trennpuffer	0,5 ml	1,5 ml
H <sub>2</sub> O <sub>millipore</sub>	1,2 ml	2,5 ml
APS, 10 % (w/v in H <sub>2</sub> O <sub>millipore</sub> )	15 µl	30 µl
TEMED	3,0 µl	5,0 µl

### 6.2.2 Probenvorbereitung

<u>2 x Probenpuffer</u>	Glycerin	ca. 10 % (v/v)
	SDS	5,0 % (w/v)
	Tris/HCl pH 7,5	50 mM
	Na <sub>2</sub> EDTA	10 mM
	BPB	0,01 % (w/v)
	DTT	5,0 mM

Nach Zugabe eines äquivalenten Volumens des 2 x Probenpuffers wurden die Proben für 15 Min. bei 95 °C im Wasserbad (Thermoinkubator, Haake DC3, Haake, Karlsruhe) inkubiert. Vor Gebrauch wurde der Puffer durch die Zugabe des reduzierenden Agens DTT im Verhältnis 1 + 19 (DTT zu 2 x Puffer) vervollständigt.

### 6.2.3 Elektrophoresebedingungen

<u>Laufpuffer – Kathode</u>	Tris/HCl pH 8,3 (ergibt sich)	100 mM
	Tricin	100 mM
	SDS	0,1 % (w/v)
<u>Laufpuffer – Anode</u>	Tris/HCl pH 8,8	200 mM

Die Auftrennung der denaturierten Proteine im elektrischen Feld erfolgte zunächst bei 12 mA (Sammelgel) und anschließend bei 24 mA (Trenngel) in einer Biometra-Elektrophoreseapparatur bei Raumtemperatur (Apparatur: Eigenbau der Werkstatt; Powersupply: MBP 3000 EP, IBI Powersupplies, Kodak Int. Biotech. New Haven, USA).

Die Elektrophorese wurde in einem diskontinuierlichen Tris-Tricin-Laupuffer-System nach Schägger von Jagow (1987) durchgeführt, welches im Vergleich zum Lämmli-System (Laemmli, 1970) für die Trennung kleiner Proteine und Peptide optimiert ist.

### 6.2.4 Färbungsmethoden und Dokumentation

Die Inkubation der Gele im Verlauf der einzelnen Färbeschritte erfolgte unter Schütteln bei Raumtemperatur.

#### Coomassiefärbung

<u>Coomassie-Färbelösung</u>	Ethanol	40 % (v/v)
	Essigsäure	10 % (v/v)
	Coomassie Brilliant Blue R 250	0,1 % (w/v)
über Nacht Rühren und anschließend abfiltrieren		
<u>Coomassie-Entfärbelösung 1</u>	Ethanol	40 % (v/v)
	Essigsäure	10 % (v/v)
<u>Coomassie-Entfärbelösung 2</u>	Essigsäure	10 % (v/v)

Die Coomassiefärbung von SDS-Gelen und PVDF-Membranen (Immobilon P, Millipore, Eschborn) diente neben der Abschätzung einer ungefähren Proteinkonzentration vor allem der Detektion von Proteinbanden im Vorfeld einer massenspektrometrischen Proteinidentifikation (siehe Kap. II. 13.2). Konnte eine Bande mit Hilfe der hier beschriebenen Färbungsmethode in einem SDS-Gel oder auf einer PVDF-Membran detektiert werden, so erfüllte sie den Anspruch an eine Mindestproteinkonzentration für eine anschließende Proteinidentifikation. Die Nachweisgrenze der klassischen Coomassiefärbung liegt bei ca. 400 ng Protein pro cm<sup>2</sup>.

SDS-Gele wurden für 30 Min. in Coomassie-Färbelösung inkubiert, bevor sie für weitere 30 Min. in Entfärbelösung 1 und 60 Min. in Entfärbelösung 2 gewaschen wurden. Für eine vorübergehende Lagerung wurden die Gele mit einer 1%igen Essigsäurelösung überschichtet.

PVDF-Membranen wurden mit Hilfe der "PageBlue™ Protein Staining Solution" (R0579, Fermentas, St. Leon-Rot) nach Herstellerangaben gefärbt. Dazu wurde die Membran im Anschluss an den Elektrotransfer getrocknet und für 1 - 2 Min. in der Färbelösung inkubiert. Die Entfärbung erfolgte anschließend in 30 % Ethanol (v/v in H<sub>2</sub>O<sub>Millipore</sub>). Die verwendete Fertiglösung zeichnete sich zum einen durch eine hohe Sensitivität und zum anderen durch eine gute Reproduzierbarkeit gegenüber selbst hergestellten klassischen Coomassie-R-250-Lösungen aus.

### Silberfärbung

Die Methode der Silberfärbung ist gegenüber der klassischen Coomassiefärbung um den Faktor 40 sensitiver (Blum *et al.*, 1987, Proteinnachweisgrenze im Gel 10 ng/cm<sup>2</sup>). Auf diese Weise konnte eine Reduzierung des Probenverbrauchs erzielt werden, weshalb vorrangig die Silberfärbung als Darstellungsverfahren von Proteinbanden im Gel gewählt wurde. Da es im Verlauf der Silberfärbung infolge des Einsatzes von Formaldehyd zu einer Quervernetzung der Proteine im SDS-Gel kommt, konnten die so detektierten Proteinbanden aus technischen Gründen nicht für eine massenspektrometrische Analyse eingesetzt werden.

Für die Silberfärbung von SDS-Gelen wurde nach folgendem Protokoll vorgegangen:

Lösung	Inkubationsdauer	Substanz	Konzentration
Fixieren	30 Min.	Methanol	50 % (v/v)
		Essigsäure	10 % (v/v)
Waschen I	10 Min.	Ethanol	50 % (v/v)
Waschen II	10 Min.	Ethanol	10 % (v/v)
Blockieren	1 Min.	Natriumthiosulfat	0,02 % (w/v)
Waschen III	3 x 20 Sek.	H <sub>2</sub> O <sub>millipore</sub>	
Färben	20 Min.	Silbernitrat	0,1 % (w/v)
		Formaldehyd	0,027 % (v/v)
Waschen IV	2 x 20 Sek.	H <sub>2</sub> O <sub>millipore</sub>	
Entwickeln	verschieden	Natriumcarbonat	6,0 % (w/v)
		Formaldehyd	0,018 % (w/v)
Stoppen	mindestens 15 Min.	Essigsäure	10 % (v/v)

### Dokumentation

Geltrocknungspuffer	Ethanol	22 % (v/v)
	Glycerin	ca. 2 % (v/v)
	2-Propanol	1,0 % (v/v)
pH-Wert ergibt sich		

Neben einer digitalen Fotodokumentation wurden die Gele mit Hilfe eines Geltrocknungssystems (Dry Ease™ System, Invitrogen, Karlsruhe) konserviert. Dafür wurden sie für 15 Min. bei Raumtemperatur und unter Schütteln in einer Geltrocknungslösung inkubiert. Anschließend wurden die Gele auf einem Leuchtschirm fotografiert und zwischen zwei

Cellophanfolien (Dry Ease™ Minicellophane, Invitrogen, Karlsruhe) in einer entsprechenden Halterung über Nacht getrocknet.

### 6.3 Western-Blot

#### 6.3.1 Elektroblot von Proteinen auf PVDF-Membranen

<u>Transferpuffer</u>	Tris	25 mM
	Glycin	192 mM
	Methanol	20 % (v/v)
pH 8,3 - ergibt sich		

Im Vorfeld des Elektroblots wurde die PVDF-Membran (Immobilon P, Ø 0,2 µm, Millipore, Bedford, USA) für mindestens 1 Min. in Methanol p.a. geschwenkt und auf diese Weise aktiviert. Anschließend wurden sowohl Membran und Gel als auch die benötigten Stücke Whatman® Papier (6 Stücke, zugeschnitten auf Gelgröße, Biometra, Göttingen) für 15 Min. in Transferpuffer inkubiert und nach Herstellerangaben luftblasenfrei zu einem Stapel in der Blot-Apparatur zusammengesetzt.

Der Elektroblot von Proteinen aus SDS-Polyacrylamidgelen auf PVDF-Membranen erfolgte für die Dauer von 30 Min. bei einer konstanten Spannung von 11 V in einem elektrischen Feld (Trans Blot SD Semi Dry Transfer Cell, Biorad, München).

#### 6.3.2 Immunologischer Nachweis

<u>TBS+T-Puffer</u>	Tris/HCl pH 7,6	20 mM
	NaCl	137 mM
	Tween 20 (T)	0,1 % (v/v)
	Magermilchpulver (MM)	1 %; 3 %; 5 % (w/v)
<u>Anfärbepuffer</u>	Tris/HCl pH 8,8	100 mM
	NaCl	100 mM
	MgCl <sub>2</sub> x 6 H <sub>2</sub> O	5,0 mM

Auf PVDF-Membran transferierte Proteine wurden mittels der spezifischen Bindeeigenschaften entsprechender primärer und sekundärer Antikörper (siehe Kap. II. 1.4) in Kombination mit einer enzymatisch katalysierten Reaktion nachgewiesen.

Die Membran wurde nach erfolgtem Elektroblot für 10 Min. in TBS+T-Puffer gewaschen und für 1 h in einer TBS+T-Lösung plus 5 % Magermilchpulver (MM) abgesättigt. Nachdem sie erneut für 10 Min. in TBS+T-Puffer gewaschen wurde, folgte eine mindestens einstündige

Inkubation mit primärem Antikörper (verdünnt v/v in TBS+T-Puffer plus 3 % MM). Anschließend wurden ungebundene primäre Antikörper durch intensives Waschen in TBS+T-Puffer (4 x 10 Min.) entfernt bevor die Membran für wiederum mindestens 1 h in TBS+T-Lösung plus 1 % MM inklusive sekundärem Antikörper geschwenkt wurde. Vor der abschließenden Inkubation der PVDF-Membran in der Detektionslösung wurde durch eine erneute, mehrstufige Waschprozedur ungebundener sekundärer Antikörper entfernt (3 x 10 Min. in TBS+T; 2 x 10 Min. in TBS-Puffer ohne Tween 20).

Die immunologische Detektion der entsprechenden Proteine erfolgte durch Inkubation der Membran in 10 ml Anfärbepuffer, dem 80 µl "NBT/BCIP-Stock-Solution" (Roche, Mannheim) zugegeben wurden. Die Reaktion wurde bei Sichtbarwerden der markierten Proteinbanden durch Inkubation der Membran in H<sub>2</sub>O<sub>millipore</sub> für etwa 10 Min. gestoppt. Alle Inkubationsschritte des immunologischen Nachweises wurden unter Schütteln bei Raumtemperatur durchgeführt, wobei darauf geachtet wurde, dass die Membran zu keinem Zeitpunkt antrocknet.

## 7 Solubilisierung der Membranfraktion

Im Vorfeld der Solubilisierung von entsprechenden, aus der Dichtegradienten-Zentrifugation gewonnenen Fraktionen wurden diese gegen MOPS-Puffer dialysiert (siehe Kap. II. 5.3), um die darin enthaltene Saccharose zu entfernen.

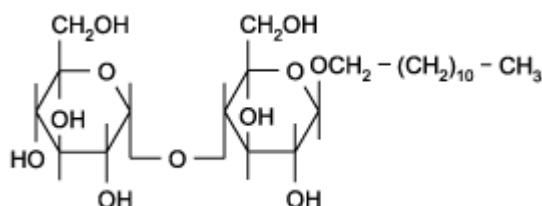


Abbildung 4: n-Dodecyl-beta-D-maltopyranosid - Strukturformel

Für die Solubilisierung wurde das nichtionische Detergenz n-Dodecyl-beta-D-maltopyranosid (DDM, siehe Abb.1; CMC= 0,15 mM bzw. 0,0077 % (w/v); Mg<sub>Mizelle</sub>= ca. 50 kDa) in einer Konzentration von 0,5 % (w/v) pro 1 mg/ml (Proteinkonzentration der Fraktion) eingesetzt. Die Solubilisierung fand anschließend für 1 h unter Schütteln bei 25 °C statt. Um die so gelösten Proteine von nichtsolubilisierten Proteinen und Lipiden zu trennen, wurde der Ansatz für 1 h bei 100.000 x g zentrifugiert (Kleinmaßstab: 48.000 UPM, 25 °C, TLA55-Rotor, Beckman Optima™ Max-E Ultrazentrifuge; Großmaßstab: 31.200 UPM, 25 °C, 70-Ti-Rotor; Beckman Optima™ LE-80K Ultrazentrifuge, Beckman Coulter, Unterschleißheim). Die Solubilisierungseffizienz wurde durch einen vergleichenden Auftrag von Überstand und resuspendiertem Pellet mit Hilfe einer SDS-PAGE (siehe Kap. II. 6.2) überprüft. Das Pellet wurde dazu in einem zum Überstand äquivalenten Volumen MOPS-Puffer aufgenommen.

## 8 Proteinaufreinigung

Die native Aufreinigung des dominierenden Proteins der äußeren Membran von *Ignicoccus hospitalis*, Ihmop1, wurde in einem dreistufigen chromatographischen Verfahren durchgeführt. Das Protokoll umfasst aneinandergereiht einen Anionen- und Kationenaustauscherschritt sowie eine Gelfiltration des aus dieser Vorreinigung gewonnenen Durchlaufes. Alle chromatographischen Arbeiten wurden an einem ÄKTA™FPLC™, Frac-950 System (GE-Healthcare, Uppsala, S) unter Verwendung von entsprechenden vorgepackten Säulen (GE-Healthcare, Uppsala, S) nach den Angaben des Herstellers durchgeführt. Sämtliche Puffer und Lösungen wurden vor dem Gebrauch filtriert und mit Hilfe einer Wasserstrahlpumpe entgast. Die Absorptionsmessungen im Verlauf der Chromatographien erfolgten bei 280 nm.

### 8.1 Ionenaustauscher-Chromatographie

Puffer für die Proteinaufreinigung (pH 7,2)	Puffer A'		Puffer B'	
modifizierter MOPS-Puffer (siehe Kap. II. 5.2)	NaCl	50 mM	NaCl	1 M
	DDM	0,05 % (w/v)	DDM	0,05 % (w/v)

Das Prinzip der Ionenaustauscher-Chromatographie (IEX) basiert auf der Affinität von geladenen Biomolekülen, wie beispielsweise Proteinen, gegenüber einer ebenfalls geladenen stationären Matrix. Je nach Ladung der Matrix unterscheidet man nach Anionen- und Kationenaustauschern, wobei im Falle der Anionenaustauscher-Chromatographie eine positiv geladene Matrix für die Wechselwirkung mit den negativ geladenen Aminosäureseitenketten der Proteine exponiert ist. Diese Wechselwirkung beeinflusst im Folgenden die Mobilität des entsprechenden Proteins während der Chromatographie. Je stärker die Interaktion ist, desto langsamer durchläuft das Protein die Trennstrecke. Im Falle des Kationenaustauschers verhalten sich die Ladungseigenschaften umgekehrt.

Die Wechselwirkung eines Proteins ist durch die Variation verschiedener Laupufferparameter, wie pH-Wert und Ionenstärke, beeinflussbar, wodurch eine gezielte Elution der mit der Matrix interagierenden Proteine ausgelöst werden kann. In der Regel werden Affinitäts-Chromatographien, denen die IEX zuzuordnen ist, eingesetzt, um ein bestimmtes Protein durch Bindung an eine entsprechende Matrix von anderen Proteinen abzutrennen und so aufzukonzentrieren. Eine andere Herangehensweise ist eine Aufreinigung, welche nicht auf der Bindung des gesuchten Proteins, sondern möglichst vieler anderer Proteine der Lösung basiert. Obwohl diese Aufreinigungsmethode weniger effektiv ist, wurde sie im Rahmen dieser Arbeit eingesetzt, da das gesuchte Ihmop1-Protein unter keinem der getesteten Parameter eine Affinität zu den verwendeten Medien zeigte.

Für die Abtrennung geladener Proteine aus den entsprechenden Fraktionen wurden starke Ionenaustauscher verwendet. Starke Austauscher zeichnen sich durch eine konstante Ladung und damit eine gleich bleibende Selektivität und Kapazität über einen weiten pH-Bereich aus und sind somit besonders geeignet für die Etablierung eines Aufreinigungsprotokolls.

Als Äquilibrierungs- und Ladepuffer für die Ionenaustauscherchromatographie wurde Puffer A', ein MOPS-Puffer mit einer niedrigen NaCl-Konzentration verwendet (siehe Kap. II. 5.2), um eine Bindung geladener Proteine an die Matrix der verwendeten Säule (HiTrap Q (HP)) zu gewährleisten. Im Anschluss an den Probenauftrag wurde die Säule wiederum mit Puffer A' gewaschen, um ungebundene Proteine vollständig aus dem System zu entfernen. Die Elution erfolgte anschließend durch Mischen des Laupuffers mit Puffer B' und somit durch eine Erhöhung der Ionenstärke des Laupuffers in Form eines Gradienten. Der Gradient wurde je nach Ansatz unterschiedlich breit gewählt. Die Ionenstärke stieg im Verlauf des Gradienten von 50 mM NaCl bis zu einem Wert von 1 M NaCl an (0 % → 100 % Puffer B'). Im Anschluss wurde die Säule mit Puffer B' gewaschen, um restliches Protein vollständig zu entfernen.

### 8.1.1 Durchführung

Ionenaustauscher-Chromatographie	Puffer	Flussrate	Volumen [SV]	Fraktionierung
1. Äquilibrierung	100 % A'	2 ml/Min.	5 - 10	Nein
2. Probenauftrag	100 % A'	0,5 ml/Min.	Probenvolumen	Ja
3. Waschen I	100 % A'	0,5 ml/Min.	1 - 3	Ja
4. Elution via Gradient	0 % → 100 % B'	0,5 ml/Min.	1 - 10	Ja
5. Waschen II	100 % B'	2 ml/Min.	5	Ja

Im ersten Auf trennungsverfahren wurde die entsprechend solubilisierte Probe in die Anionenaustauscher-Chromatographie (HiTrap Q (HP)) eingesetzt. Der während der Schritte 2 und 3 der Anionenaustauscher-Chromatographie aufgefangene Durchlauf an ungebundenem Protein wurde zur Optimierung der Aufreinigung vereinigt und ein zweites und drittes Mal in die Auf trennung eingesetzt. In der folgenden Kationenaustauscher-Chromatographie (HiTrap SP (HP)) wurde der Durchlauf der Anionen-Chromatographie analog dazu weiter bearbeitet. Der daraus gewonnene, voraufgereinigte Durchlauf konnte nun in die Gelfiltration eingesetzt werden.

## 8.2 Gelfiltrations-Chromatographie

Das Trennprinzip der Gelfiltration (GF) beruht entgegen der IEX nicht auf Affinitäten, sondern auf Größenunterschieden der in der Probe enthaltenen Biomoleküle. Je größer ein Komplex ist, desto schneller passiert er die Säule. Kleinere Moleküle, Salze und andere Puffersubstanzen dringen hingegen in die Matrix der Säule ein, sodass sie in ihrer Laufgeschwindigkeit verlangsamt werden. Es handelt sich um eine sehr schonende Art der Chromatographie, da ein pH-Wert bzw. ionenstärkeabhängiger Elutionsschritt entfällt. Somit ist die Trennleistung der GF nicht direkt abhängig von der Pufferzusammensetzung. Eine niedrige Flussrate sowie eine lange Trennstrecke wirken sich dabei positiv auf die Trennleistung aus.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde eine HiLoad 16/60 Superdex 200 pg Gelfiltrationssäule für die Aufreinigung nach Herstellerangaben eingesetzt.

Im Vorfeld der Trennung wurde die Säule mit Puffer A' äquilibriert. Nach dem Erreichen konstanter Werte für den Systemdruck und pH-Wert wurde die Probe aufgetragen. Die Elution erfolgte anschließend für 1 - 1½ Säulenvolumen, ebenfalls mit Puffer A', bis zu einem konstant niedrigen UV-Adsorptionssignal nahe dem Nullwert.

### 8.2.1 Durchführung

Gelfiltrations-Chromatographie	Puffer	Flussrate	Volumen in SV	Fraktionierung
1. Äquilibrierung	A'	1 ml/Min.	1	Nein
2. Probenauftrag	A'	0,5 ml/Min.	Probenvolumen	Ja
3. Elution via Gradient	A'	0,5 ml/Min.	1 – 1½	Ja

## 8.3 Reinheitskontrolle der aufgereinigten Fraktionen

Um einen Eindruck über die Proteinzusammensetzung der gewonnenen Fraktionen zu gewinnen, wurde die Proteinaufreinigung von einer gelelektrophoretischen Voruntersuchung (siehe Kap. II. 6.2) bestimmter Fraktionen begleitet. Ausgewählte Proben wurden zudem in eine massenspektrometrische Analyse eingesetzt, mit deren Hilfe der Aufreinigungsgrad der Proben bezüglich des Ihomp1-Proteins bestimmt werden sollte. Auf einen tryptischen Vorverdau der entsprechenden Proben wurde in diesem Fall verzichtet.

Im Zuge der Reinheitskontrolle durch MALDI MS wurden die Proben durch den Einsatz eines Lasers für die Messung ionisiert, wodurch die Ihomp1-Komplexe in Monomere einer bekannten Masse von 6,23 kDa dissozierten. Anhand dieser bekannten Monomermasse konnte eine Aussage über den Reinheitsgrad der getesteten Probe getroffen werden.

Voraussetzung für diese hochempfindliche Nachweistechnik ist ein möglichst salzfreies Medium, welches durch Dialyse der entsprechenden Proben (siehe Kap. II. 5.3) gegen einen 20 mM NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>-Puffer (w/v in H<sub>2</sub>O<sub>millipore</sub>; pH-Wert ergibt sich) geschaffen wurde.

Die Reinheitskontrolle wurde entgegen der klassischen, auf Peptidmassen beruhenden MALDI TOF PMF-Technik für die Proteinidentifikation (siehe Kap. II. 13.2) nicht im Reflektor-, sondern im Linear-Modus durchgeführt. Diese Umstellung hat Einfluss auf den Auflösungs- und Messbereich und trägt der im Vergleich mit tryptischen Peptiden hohen Masse des Ihomp1-Monomers Rechnung. Die massenspektrometrische Analyse der Proben wurde von Eduard Hochmuth am Institut für Biochemie der Universität Regensburg im Labor von Prof. Dr. Deutzmann an einem 4700 Proteomics Analyzer - MALDI MS/MS-Gerät (Applied Biosystems, Foster City, USA) durchgeführt.

## 9 Circulardichroismus-Spektroskopie

<u>Phosphat-Puffer I</u>	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	10 mM
	NaCl	150 mM
	MgCl <sub>2</sub> x 6 H <sub>2</sub> O	3 mM
pH 6,5 - mit 10 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> einstellen		

Die im Rahmen der Circulardichroismus-Spektroskopie (CD-Spektroskopie) durchgeführten Messungen fanden in Zusammenarbeit mit Klaus-Jürgen Tiefenbach am Institut für Biophysik und physikalische Biochemie der Universität Regensburg (Abt. Prof. Dr. R. Sterner) statt. Ziel dieser Studien war die Bestimmung der charakteristischen Sekundärstrukturmerkmale des dominierenden Proteins der äußeren Membran von *I. hospitalis*, Ihomp1.

Im Vorfeld der Messungen wurden aufgereinigte Ihomp1-Proben durch Dialyse (siehe Kap. II. 5.3 und Kap. II. 8) in einen mit dem Messsignal weniger stark interferierenden Phosphat-Puffer I überführt. Das CD-Signal wurde im Wellenlängenbereich des Fern-UV-Spektrums von 170 - 250 nm (in Abständen von  $\lambda = 0,5$  nm) in einer Quarzküvette mit einer Schichtdicke von 0,1 mm aufgenommen (J-815 CD-Spektrometer; Jasco, Groß-Umstadt). Die abschließende Auswertung der erhaltenen Rohdaten bezüglich des Absorptionsverhaltens der Probe bei verschiedenen Wellenlängen wurde mit Hilfe der Software "CDNN 2.1 - Simple spectra" (Böhm *et al.*, 1992) und der serverbasierten Anwendung Dichroweb (Withmore und Wallace, 2004 und 2008) durchgeführt, welche eine Auswahl von Algorithmen für die Datenanalyse bereitstellt (z.B. CONTINLL, SELCON3, CDSSTR, K2D).

## 10 Stöchiometrische Analysen - LILBID Massenspektrometrie

Die Analyse des Oligomerisierungsgrades des Ihomp1-Membranproteinkomplexes mittels LILBID Massenspektrometrie (*Liquid bead laser induced ion desorption*; Kleinekofort *et al.*, 1996; Morgner *et al.*, 2006 und 2007) sollte Aufschluss über die Stöchiometrie des nativen Komplexes geben. Das 1996 erstmals beschriebene, hochsensitive und schonende Verfahren dient der spezifischen Analyse von nichtkovalent verbundenen Biomolekülen.

Die Technik bietet entgegen der klassischen, matrixgestützten MALDI MS/MS-Technik den Vorteil, die für die Analyse notwendigen Ionen durch eine regulierbare Laseranregung direkt aus einer flüssigen Phase zu gewinnen. Verglichen mit der ebenfalls auf flüssigen Proben basierenden ESI-MS/MS-Technik (Fenn *et al.*, 1989, Nobelpreis für Chemie 2002), einer weiteren klassischen massenspektrometrischen Methode, zeigt die LILBID MS eine höhere Ionisierungsrate sowie eine bessere Verträglichkeit gegenüber erhöhten Salz- und Detergenzkonzentrationen. Dies ermöglicht den Erhalt der natürlichen Probenbedingungen, wodurch das Risiko einer Artefaktbildung im Verlauf der Probenpräparation, speziell im Falle der MALDI-MS, reduziert wird.

Die in der solubilisierten Probe enthaltenen Ionen treten im Verlauf der Analyse bereits bei Laserintensitäten von  $100 \text{ MW/cm}^2$  durch die Anregung von OH-Schwingungen in das Vakuum aus. Es handelt sich dabei nicht um einen Verdampfungsprozess, sondern um eine schnelle Abtragung der Probenoberfläche durch die Einwirkung des Lasers, bei der die Flüssigkeit explosionsartig aufgebrochen wird. Die dabei freigesetzten Ionen werden anschließend in einem elektrischen Feld beschleunigt und analog zu einer klassischen TOF-MS in einem Flugrohr bezüglich Masse und Ladung analysiert.

Das Problem des eruptionsartigen Verdampfens von Flüssigkeiten im Hochvakuum ( $p = 10^{-3}$  -  $10^{-7} \text{ mbar}$ ) wird durch den Einsatz eines piezogetriebenen Mikrotropfengenerators (*on-demand droplet generator*) umgangen, welcher in der Lage ist, definiert kleine Flüssigkeitstropfen (*beads*,  $\varnothing = 50 \mu\text{m}$ ) mit einer hohen Geschwindigkeit (10 Hz) punktgenau in das Vakuum einzubringen. Die zeitlich daran gekoppelte Laseranregung ( $t \text{ Puls} = 6 \text{ ns}$ ,  $\varnothing = 300 \mu\text{m}$ ) erfolgt ebenso schnell wie fokussiert bei einer Wellenlänge von  $3 \mu\text{m}$ , sodass der Kontakt der flüssigen Probe mit dem Vakuum zeitlich stark reduziert werden kann. Eine Kühlfalle entfernt zudem überschüssige Probe aus dem System.

### 10.1 Vorbereitungen für die LILBID Massenspektrometrie

Die zu untersuchenden Proben wurden im Anschluss an die chromatographische Aufreinigung (siehe Kap. II. 8) über einen zusätzlichen Gelfiltrationsschritt in einen für die Analyse geeigneten Puffer ( $10 \text{ mM NH}_4\text{HCO}_3 + 0,05 \% \text{ DDM}$ ; w/v in  $\text{H}_2\text{O}_{\text{millipore}}$ ) überführt. Anhand des daraus resultierenden Chromatographieprofils wurden entsprechend reine

Fraktionen ausgewählt, miteinander vereinigt und auf eine Mindestkonzentration von  $10^{-6}$  Molar konzentriert (Amicon Ultra 15, mwco 100k; Millipore, Billerica, USA).

Die LILBID MS Analysen wurden in Kooperation mit dem Institut für Physikalische und Theoretische Chemie an der Universität Frankfurt a. M. (Abt.: Prof. Dr. B. Brutschy) von Dr. Nina Morgner und Lucie Sokolova durchgeführt.

## 11 3D-Kristallisation für die Röntgenstrukturanalyse

Für die Beschreibung eines Proteinkomplexes ist die Bestimmung seiner 3-D Struktur ein wichtiger Bestandteil. Die bevorzugte Methode, um eine solche Struktur zu ermitteln, ist die Technik der Röntgenkristallstrukturaufklärung. Es gibt zahlreiche Parameter, über welche eine Kristallisation beeinflusst werden kann, dazu zählen unter anderem die Reinheit und Konzentration des Proteins, das verwendete Detergent in Typ und Konzentration, der umgebende Puffer sowie der pH-Wert (Weber, 1997). Die kritischen Arbeitsschritte dieser Methode sind die Etablierung einer effizienten Aufreinigungsmethode sowie die daran anschließende Züchtung gut streuender Kristalle, welche eine geordnete und periodische Struktur aufweisen. Im Rahmen dieser Arbeit wurde der Schritt der Kristallzüchtung und -vermessung in Kooperation mit dem Biozentrum der Universität Basel (CH) in der Abteilung für strukturelle Biologie und Biophysik unter der Leitung von Prof. Dr. Tilman Schirmer von Dr. Caroline Peneff durchgeführt.

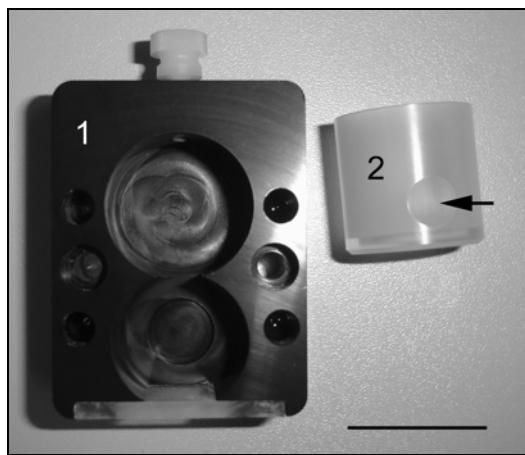
Das zu untersuchende Ihomp1-Protein wurde im Vorfeld aufgereinigt (siehe Kap. II. 8) und für die Kristallisation aufkonzentriert (Amicon Ultra 15, mwco 100k; Millipore, Billerica, USA). Die Kristallisation erfolgte in einem als Dampfdiffusion bezeichneten Verfahren bei 25 °C unter Austestung unterschiedlicher Puffer- und Solubilisierungsbedingungen. Aufgrund der durch den Einsatz von Detergents herabgesetzten Oberflächenspannung der Kristallisationsansätze wurde entgegen der gebräuchlichen *hanging-drop* Methode die *sitting-drop* Methode gewählt. Die Ansätze wurden mit bestimmten Mengen des Fällungsmittels PEG vermischt, welches auf diese Weise verdünnt wurde. In einem abgeschlossenen System standen die Ansätze anschließend mit einem vergleichsweise großen Reservoir des unverdünnten Fällungsmittels über die Gasphase in Verbindung. Das System strebt eine Äquilibrierung an, wodurch die Proteinlösung langsam aufkonzentriert wurde und schließlich überkonzentriert vorlag. In Abhängigkeit von der Keimbildungsrate setzte ab einem bestimmten Zeitpunkt die Kristallisation ein.

Die Kristallisationsansätze wurden mit Hilfe eines Kristallisationsroboters (Biochemisches Institut, Universität Zürich) pipettiert, wodurch ein sehr probensparendes Arbeiten möglich war. Die anschließenden Messungen der Kristallbeugungsmuster wurden am SLS-Synchrotron des Paul Scherrer Instituts in Villigen (CH) durchgeführt.

## 12 Elektrophysiologische Studien

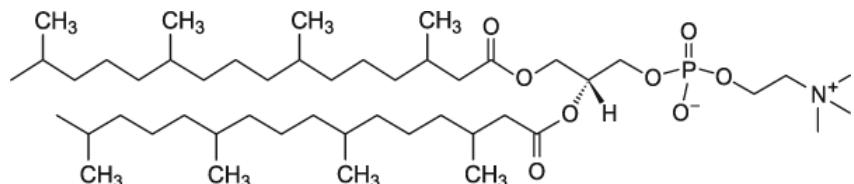
Die elektrophysiologischen Studien wurden am MPI für Entwicklungsbiologie in Tübingen in der Abteilung für Proteinevolution (Prof. Dr. A. Lupas) unter der Anleitung von Dr. Dirk Linke und Thomas Arnold nach Benz und Arnold (Benz *et al.*, 1978; Arnold *et al.*, 2007) durchgeführt. Das Ziel dieser Untersuchungen war der Nachweis eines koordinierten und spontanen Einbaus des komplexbildenden Membranproteins Ihomp1 aus *I. hospitalis* in künstliche Membranen sowie die Bestimmung einer etwaigen, daraus resultierenden signifikanten Leitfähigkeit.

Für die elektrophysiologischen Studien wurde ein Geräteset der Firma Warner Instruments (Hamden, USA) in Verbindung mit dem in Abbildung 5 dargestellten Bilayer-Kammersystem eingesetzt. Die Aufzeichnung, Verarbeitung und Auswertung der gewonnenen Daten wurde mit Hilfe des pClamp-Softwarepaketes (Version 10.0.0.61) der Firma MDS Analytical Technologies (Sunnyvale, USA), bestehend aus den Programmen Clampex und Clampfit, durchgeführt.



**Abbildung 5: Bilayer-Kammersystem für elektrophysiologische Studien.** (1) Küvettenhalter, (2): Seitenansicht der Teflonküvette mit Öffnung (Pfeil), Balken: 2 cm

Die künstlichen Membranen wurden über eine  $1 \text{ mm}^2$  große Öffnung in der Wand der Teflonküvette (Abb. 3: Pfeil) aufgespannt, nachdem die Küvette in die obere Aussparung des Küvettenhalters eingesetzt und beide Reservoirs mit Puffer gefüllt wurden. Als Puffer diente eine 1 M KCl-Lösung, gepuffert je nach pH-Wert mit 10 mM Citrat (pH 5,5), MES (pH 6,0) oder HEPES (pH 7,5). Als Lipid kam ein hochreines Diphyanoyl-Phosphatidylcholin, gewonnen aus Hühnerei (Lipoid, Ludwigshafen; Strukturformel siehe Abb. 3), zum Einsatz.



**Abbildung 6: Strukturformel von Diphyanoyl-Phosphatidylcholin**

Vor dem Einsetzen der Teflonküvette in den Halter wurde ein Lipidreservoir um die Öffnung angelegt, um die Konstruktion der künstlichen Membran zu erleichtern. Dazu wurde etwa 1  $\mu$ l eines gelösten Lipids (1 % w/v in Methanol/Chloroform (1:1, v/v)) um die Öffnung aufgetropft. Nach dem Antrocknen des Lipids wurde die Küvette eingesetzt und die Reservoirs mit jeweils 4 ml Puffer befüllt. Die Konstruktion der künstlichen Membran erfolgte durch vorsichtiges Aufstreichen von 1 - 2  $\mu$ l einer zweiten Lipidlösung (1 % w/v in n-Dekan/Butanol (9:1 v/v)) mit Hilfe eines Pinsels. Im Anschluss an die Konstruktion einer stabilen Membran wurden 2 - 10  $\mu$ l der aufgereinigten Ihomp1-Probe (siehe Kap. II. 8) in die Teflonküvette pipettiert. Die Insertion des aufgereinigten Testproteins wurde durch das Anlegen diverser hoher Spannungen (bis zu maximal +/- 400 mV) forciert und konnte über die Messung der Stromstärke kontrolliert werden.

Nach stabiler Insertion des Testproteins in die künstliche Membran wurde zur Leitfähigkeitsbestimmung die Stromstärke in einem Spannungsbereich von - 160 mV bis + 160 mV aufgezeichnet. Ein Umpuffern oder Aufkonzentrieren der Testprobe war für diese Einzelkanal-Analyse nicht erforderlich.

$$\text{Leitfähigkeit [nS]} = \frac{\text{gemessene Stromstärke [pA]}}{\text{angelegte Spannung [mV]}}$$

## 13 Proteinidentifikation

Ziel der Identifikation diverser Proteinbanden aus SDS-Polyacrylamidgelen war es, einen Einblick in die proteinbiochemische Zusammensetzung der zu untersuchenden Fraktionen zu gewinnen.

Es wurden drei unterschiedliche Techniken für die Proteinidentifikation eingesetzt: Zum einen, als klassische Sequenzierungstechnik, ein Edman-Abbau mit anschließender HPLC-Trennung (Edman, 1950; Allen *et al.*, 1989), zum anderen zwei massenspektrometrische Ansätze, die es erlaubten, gezielt einzelne Proteinbanden (MALDI MS/MS) bzw. in einem kombinierten Verfahren ganze Gelspuren oder Proteingemische (ESI Nano-LC MS/MS) zu untersuchen (Karas *et al.*, 1987; Karas und Hillenkamp, 1988; Tanaka *et al.*, 1988, Nobelpreis für Chemie 2002).

### 13.1 N-terminale Sequenzierung

Die Sequenzierung nach Edman (1949) beruht auf einer sequenziellen Degradierung der zu untersuchenden Aminosäuresequenz durch N-terminale Kopplung mit Phenylisothiocyanat (PITC). Durch die nachfolgende Umsetzung mit wasserfreier Trifluoressigsäure kommt es zu einer Zyklisierung und Freisetzung der N-terminalen Aminosäure als 2-Anilino-thiazolinon-Derivat (ATZ-Derivat). Nach Isomerisierung mit einer wässrigen Säure in ein stabileres

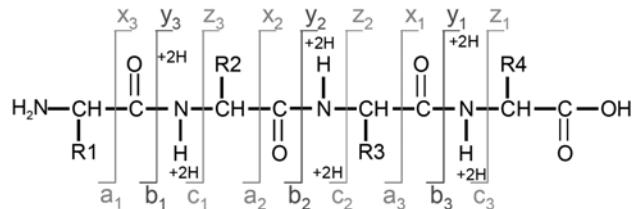
Phenylthiohydantoin-Derivat (PTH-Aminosäure) kann die Aminosäure chromatographisch analysiert und identifiziert werden. Im Rahmen einer N-terminalen Sequenzierung können bis zu 40 Zyklen aufeinander folgen und so charakteristische Aminosäuresequenzen von Proteinen bestimmt werden.

Im Vorfeld der Sequenzierung wurden die Proteine mittels SDS-PAGE aufgetrennt (siehe Kap. II. 6.2), im elektrischen Feld auf eine PVDF-Membran transferiert (siehe Kap. II. 6.3.1), durch Coomassiefärbung sichtbar gemacht (siehe Kap. II. 6.2.4) und durch Ausschneiden isoliert. Die weiterführenden Arbeitsschritte der N-terminalen Sequenzierung wurden von Eduard Hochmuth am Institut für Biochemie der Universität Regensburg im Labor von Prof. Dr. Deutzmann durchgeführt. Die so erhaltenen charakteristischen N-terminalen Aminosäuresequenzen wurden für die Proteinidentifikation mit den vorhandenen Genomdaten abgeglichen und bioinformatisch ausgewertet.

### 13.2 Massenspektrometrie

Die TOF PMF-Massenspektrometrie (kurz MS) basiert auf der durch gepulste Laseranregung diskontinuierlich hervorgerufenen Herauslösung und Ionisierung von Biomolekülen aus einer festen Matrix (MALDI: *Matrix assisted laser desorption/ionization*; Karas *et al.*, 1987; Tanaka *et al.*, 1988, Nobelpreis für Chemie 2002) bzw. aus flüssigen Proben (ESI: *Electron spray ionization*; Fenn *et al.*, 1989, Nobelpreis für Chemie 2002). Die so ionisierten Analyte werden anschließend in einem elektrischen Feld beschleunigt und entsprechend ihres Masse-zu-Ladung-Verhältnisses ( $m/z$ ) in einem Flugrohr aufgetrennt (TOF: *time of flight* bzw. MS). Ein als Reflektor wirkendes Gegenfeld am Ende des Flugrohres fokussiert die Ionen und lenkt sie in die entgegengesetzte Richtung auf einen Detektor um. Durch diesen so genannten Reflektormodus wird die Auflösung und Sensitivität der Methode deutlich erhöht. Je niedriger die Masse und je höher die Ladung eines Ions, desto schneller passiert es die Flugstrecke. Die Masse der Moleküle pro Ladung ergibt sich folglich direkt aus der Dauer der Flugzeit.

In der Proteomik werden Proteine in der Regel jedoch nicht direkt massenspektrometrisch analysiert, sondern ihre durch proteolytische Spaltung mit einer spezifischen Protease im Vorfeld der Messung erzeugten Peptide (PMF: *peptide mass fingerprint*). Im Anschluss an diesen kurz als MS bezeichneten ersten Schritt können ausgewählte Peptide/Ionen in einem zweiten Schritt, nach erneuter Desorption und Ionisation, aus der Matrix durch Kollision mit einem Inertgas (Argon oder Stickstoff) in charakteristische Fragmente zerlegt werden (Tandem-MS, kurz MS/MS; Papayannopoulos, 1995; Kolker *et al.*, 2006). Durch die bevorzugte Fragmentierung an Peptidbindungen werden so Ionen erzeugt, deren Massendifferenz einen direkten Rückschluss auf die Aminosäuresequenzen und Peptidmodifikationen zulässt. Abbildung 7 zeigt die typischen Fragmentierungsmuster bei der Analyse von Peptiden in MS/MS-Messungen.



**Abbildung 7: Fragmentierung und Nomenklatur der Fragmentationen nach Roepstorff und Fohlman, 1984**

In Kombination mit den entsprechenden Genomdaten können die so aufgezeichneten Peptid- bzw. Fragmentmassen einzelnen Proteinen zugeordnet werden. Auf diese Weise ist eine eindeutige Identifikation von Proteinen, selbst aus Proteingemischen, möglich.

Durch die Technologie der Tandem-Massenspektrometrie wurde die so genannte "Shotgun-Proteomik" ermöglicht. Eine komplexe Probe wird proteolytisch verdaut, was in einem weitaus komplexeren Gemisch aus Peptiden resultiert. Diese Gemische werden durch eine Kopplung der Massenspektrometrie mit meist mehrdimensionalen chromatographischen Trennsystemen für die MS/MS-Analyse vorbereitet. Dabei geht die für eine PMF-Identifizierung essentielle Information über die Peptidzugehörigkeit zu einem Protein verloren, dennoch ist es im Idealfall möglich, durch die Sequenzinformation nur eines Peptides ein Protein eindeutig zu identifizieren. Dieses Vorgehen wird auch als "*bottom-up*-Ansatz" bezeichnet.

In der vorliegenden Arbeit wurde bezüglich der Proteinidentifikation sowohl eine MALDI-MS/MS-Massenspektrometrie als auch ein bottom-up-Ansatz (ESI Nano-LC MS/MS) eingesetzt, wobei bei diesem Verfahren eine zweistufige Flüssigkeitschromatographie (LC: *liquid chromatography*) als zusätzlicher Trennschritt vorgeschaltet wurde.

### 13.2.1 MALDI MS/MS

Im Vorfeld der MALDI MS/MS-Analyse wurden die Proben einem In-Gel-Verdau unterzogen. Dazu wurden die entsprechenden Proben elektrophoretisch aufgetrennt, das betreffende SDS-Gel coomassiegefärbt (siehe Kap. II. 6.2), in  $\text{H}_2\text{O}_{\text{millipore}}$  gewaschen (1 h bzw. über Nacht) und die entsprechenden Proteinbanden durch Ausschneiden isoliert. Nachdem das Volumen der isolierten Proteinbanden bestimmt wurde, wurden diese in kleine Würfel (Kantenlänge ca. 1 mm) geschnitten, um eine Oberflächenvergrößerung zu erzielen. Die Gelwürfel wurden in 2 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß (ERG) überführt und unter leichtem Schütteln für jeweils 30 Min. in 200  $\mu\text{l}$  der folgenden Waschlösungen inkubiert:

- 1) 50 mM Ammoniumhydrogencarbonat
  - 2) 50 mM Ammoniumhydrogencarbonat, 25 % (v/v) Acetonitril (ACN)
  - 3) 25 % (v/v) ACN
  - 4) 50 % (v/v) ACN

Die Gelwürfel wurden anschließend in 0,5 ml ERG überführt und für mindestens 1 h bis zur Trockne lyophilisiert (Lyophilie: Typ Alpha 1-4; Christ, Osterode). Für den proteolytischen Verdau wurden die lyophilisierten Gelwürfel mit dem 1,5fachen des bestimmten Gelvolumens an Verdau-Lösung versetzt. Die Verdau-Lösung setzte sich aus einer sauren Lösung von inaktivem Trypsin und einer Ammoniumhydrogencarbonat-Lösung als Aktivator zusammen. 25 µg Trypsin wurden in 180 µl 1 mM HCl gelöst und mit 420 µl 0,1 M NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> auf einen pH-Wert von 8,5 eingestellt. Der Verdau fand bei 37 °C unter leichtem Schütteln für 2 bis 18 h statt.

Protease	Puffer	Inkubationsdauer
Trypsin	0,1 M Ammoniumhydrogencarbonat; w/v in H <sub>2</sub> O <sub>Millipore</sub> ; pH 8,5	12 - 18 h

Im Anschluss an den Verdau erfolgte die Extraktion der gewonnenen Peptide aus den Gelwürfeln. Der Überstand des Trypsinverdaus wurde abgenommen und die Gelwürfel für jeweils 1 - 2 h zweimal mit je 30 µl 100 mM Ammoniumhydrogencarbonat sowie einmal mit einem Gemisch aus 100 mM Ammoniumhydrogencarbonat und 25 % ACN bei 37 °C inkubiert. Die erhaltenen Extrakte wurden mit dem Überstand aus dem Trypsinverdau vereinigt und bis zur Trockne lyophilisiert.

Die anschließende massenspektrometrische Analyse der gewonnenen Peptide wurde von Eduard Hochmuth am Institut für Biochemie der Universität Regensburg im Labor von Prof. Dr. Deutzmann an einem 4700 Proteomics Analyzer - MALDI MS/MS-Gerät (Applied Biosystems, Foster City, USA) durchgeführt.

Für die Datenbanksuche gegen die NCBI Proteindatenbank (Version: Februar, 2008) wurde die "Mascot" Software (Perkins *et al.*, 1999) unter Verwendung der folgenden Parameter eingesetzt: Messbereich 800 - 4000 Da, Signal-Rausch-Verhalten Faktor 10, 45 ppm Peptidmassentoleranz, mögliche Modifikationen der Aminosäuren Methionin (Oxidation) und Cystein (Bindung von Acrylamid). Das Kriterium für eine eindeutige Identifizierung war ein signifikanter so genannter Mascot Scorewert von >80 (P < 0.05; score:-10\*log(P); P gibt die Wahrscheinlichkeit an, dass das Ergebnis ein Zufallsergebnis ist). Fragwürdige Identifizierungen wurden zusätzlich manuell überprüft.

### 13.2.2 ESI Nano-LC MS/MS

Komplexe Peptidmischungen wurden in einem kombinierten LC-MS/MS-Verfahren chromatographisch getrennt und das Eluat in einem sogenannten Online-Verfahren in einer ESI-MS direkt massenspektrometrisch vermessen (Ducret *et al.*, 1998; Washburn *et al.*, 2001; Ishihama, 2005).

Analog zu der in Kapitel II. 13.2.1 beschriebenen MALDI MS/MS-Technik wurden die zu untersuchenden Proben im Vorfeld der Messung für einen In-Gel-Verdau (modifiziert nach

Shevchenko *et al.*, 1996) elektrophoretisch aufgetrennt und die darin enthaltenen Proteine mit Hilfe einer Coomassiefärbung sichtbar gemacht (Kap. II. 6.2). Dabei kamen, entsprechend der Sensitivität der Methode, neben selbst hergestellten SDS-Gelen auch hochreine, kommerzielle SDS-Polyacrylamidgele der Firma Invitrogen (Novex®, 10 % Tricine Gel, 1.0 mm, 10 well, Invitrogen, Karlsruhe) nach Herstellerangaben zum Einsatz. Sowohl der In-Gel-Verdau wie auch die anschließenden Analysen wurden in Kooperation mit dem Institut für Membranbiochemie am MPI für Biochemie in Martinsried von Dr. Frank Siedler durchgeführt. Die durch tryptischen In-Gel-Verdau gewonnenen Peptide wurden chromatographisch getrennt (*Ultimata* 3000 Chromatographie-System; Dionex, Idstein), wobei die Peptidfraktionen zunächst über eine Vorsäule entsalzt wurden (selbst hergestellt, ReproSil-Pur 200 C18-AQ, 5 µm; Dr. Maisch GmbH, Ammerbuch; i.D. 25 mm, Länge 10 cm). Die Trennung der Peptide erfolgte in einem zweiten Schritt über eine weitere Säule (selbst hergestellt, ReproSil-Pur 200 C18-AQ, 3 µm; i.D. 75 µm, Länge 15 cm). Die durch stufenweise Elution (kontinuierlicher Gradient: 0 - 100 % ACN) gewonnenen Peptide wurden direkt in die Ionisation und massenspektrometrische Analyse eingesetzt.

Die anschließende Aufnahme der Massenspektren erfolgte an einem HCT ultra PTM Massenspektrometer (Quadrupol; Bruker Daltonik, Bremen) im *positive ion mode* mit einer Kapillarspannung von 1,2 kV in einem Massenbereich von 300 - 1600 m/z im MS und 150 - 2500 m/z im MS/MS-Modus. Aus den Rohdaten wurde mit Hilfe der "DataAnalysis-Software" (Vers. 4.0, Bruker Daltonik, Bremen) zunächst eine Peakliste erstellt, welche anschließend für die Datenbanksuche gegen die NCBI Proteindatenbank (Version: Februar, 2008) mit der "Mascot" Software eingesetzt wurde. Dabei wurden folgende Parameter verwendet: Massentoleranz 1,25 Da (MS-Modus) bzw. 0,5 Da (MS/MS-Modus), variable Modifikation: Oxidation von Methioninen sowie eine fehlende enzymatische Schnittstelle, festgesetzte Modifikation: Carbamidomethylierung von Cysteinen. Um die umfangreiche Auswertung zu beschleunigen, wurde die Datenbankrechereche zudem durch den Einsatz der "Mascot-Daemon-Software" automatisiert.

Als Kriterium für eine eindeutige Identifizierung diente ein signifikanter Mascot Scorewert von >20 ( $P < 0.05$ ;  $\text{score} = -10 \cdot \log(P)$ ; P gibt die Wahrscheinlichkeit an, dass das Ergebnis ein Zufallsergebnis ist). Die im Ergebnis erhaltenen Protein-Scores stellen die Summe der jeweiligen Peptid-Ion-Scorewerte dar.

### 13.3 Bioinformatische Auswertung von Proteinsequenzen

Die annotierten Genomsequenzen von *I. hospitalis* und *N. equitans* sind sowohl am *DOE Joint Genome Institute (JGI)* als auch am *National Center for Biotechnology Information (NCBI)* hinterlegt und öffentlich zugänglich. Für die bioinformatischen Analysen der über die N-terminale Sequenzierung und Massenspektrometrie identifizierten Proteine wurden diese

mit öffentlichen Datenbanken und Algorithmen abgeglichen. Um eine übersichtliche Darstellung der Daten zu gewährleisten, wurden die im Rahmen dieser Arbeit identifizierten Proteine entsprechend der Klassifikation nach dem *Integrated Microbial Genomes (IMG) System* in diverse Kategorien eingeteilt (Markowitz *et al.*, 2008).

Molekularmassen und isoelektrische Punkte wurden mit Hilfe von **ProtParam** berechnet. Recherchen bezüglich konservierter Domänen innerhalb der jeweiligen Aminosäuresequenzen wurden durch Abgleich mit der Datenbank **PFAM** durchgeführt. Für die Signalpeptidvorhersage fanden drei verschiedene Programme Verwendung: **FlaFind**, welches archaeelle *Class III* (type IV, pilin like) Signalpeptide und ihre Pre pilin-Peptidase-Schnittstelle vorhersagt, **TatFind**, welches archaeelle und bakterielle TAT-Signalpeptide (TAT: *twin arginin translocation*) erkennt, und **Phobius**, ein Programm, das für eine kombinierte Vorhersage von Transmembran topologien und Signalpeptiden konzipiert ist. Für die Vorhersage von Transmembrandomänen und als Werkzeug für die Klassifizierung und Sekundärstrukturvorhersage von Membranproteinen wurden die folgenden Algorithmen eingesetzt: **Phobius**, **TMHMM**, **SOSUI**, **MINNOU**, **MaxSubSeq** und **BETAPRO**. Die Vorhersage von möglichen dreidimensionalen Proteinstrukturen wurde mit den Programmen **Phyre** und **TMB-Hunt** durchgeführt.

Anwendung/Version	Referenz
JGI (Version Februar, 2008)	<a href="http://www.jgi.doe.gov/">http://www.jgi.doe.gov/</a>
NCBI (Version Februar 2008)	<a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/">http://www.ncbi.nlm.nih.gov/</a>
IMG (Version 2008)	<a href="http://img.jgi.doe.gov/cgi-bin/w/main.cgi">http://img.jgi.doe.gov/cgi-bin/w/main.cgi</a>
BETAPRO	Cheng und Baldi, 2005
FlaFind 1.0	Szabó <i>et al.</i> , 2007
HMMTOP	Tusnady und Simon, 2001
MaxSubSeq	Fariselli <i>et al.</i> , 2003
MINNOU	Cao <i>et al.</i> , 2006
PFAM 22.0	Finn <i>et al.</i> , 2006
Phobius	Käll <i>et al.</i> , 2004
Phyre 0.2	Bennett-Lovsey <i>et al.</i> , 2008
ProtParam	Gasteiger <i>et al.</i> , 2005
SOSUI	Hirokawa <i>et al.</i> , 1998
TatFind 1.4	Rose <i>et al.</i> , 2002
TMB-Hunt	Garrow <i>et al.</i> , 2005
TMHMM 2.0	Krogh <i>et al.</i> , 2001

## 14 Molekulargenetische Methoden

### 14.1 DNA-Isolation

<u>Puffer A</u>	Tris/HCl pH 8,0	500 mM
	NaCl	100 mM
	Na <sub>3</sub> Citrat	1 mM
<u>Puffer B</u>	Tris/HCl pH 8,0	200 mM
	NaCl	100 mM
	SDS	4 % (w/v)
<u>CTAB/NaCl-Lösung</u>	5 M NaCl-Lösung	140 µl
	CTAB	100 mg
	H <sub>2</sub> O <sub>millipore</sub>	ad 1000 µl
	pH-Wert ergibt sich	

80 ml einer gut bewachsenen Kultur wurden durch Zentrifugation für 30 Min. bei 13000 Upm pelletiert (Zentrifuge: Avanti J-26 XP; Rotor: Ja 25.50; Beckman Coulter, Unterschleißheim), in 400 µl Puffer A aufgenommen und in ein steriles 2 ml ERG überführt (Muscholl *et al.*, 1993, modifiziert). Der Zellaufschluss erfolgte nach Zugabe von 1 Volumen Puffer B und 1 mg Proteinase K für 1 h bei 65 °C im Wasserbad (Thermoinkubator, Haake DC3, Haake, Karlsruhe). Um eine möglichst vollständige Lyse zu gewährleisten, wurde der Zellaufschluss im Anschluss dreimal bei -80 °C eingefroren und im Wasserbad bei 65 °C aufgetaut. Störende RNA-Moleküle wurden durch eine Inkubation der Lösung mit RNase A (20 mg/ml Stocklösung, w/v in TAE-Puffer (siehe Kap. II. 14.4); Gebrauchskonzentration: 0,2 mg/ml) für 60 Min. bei 37 °C aus der DNA-Präparation entfernt. Protein, welches für den Proteinase K Verdau nicht zugänglich war, wurde durch Zugabe von 130 µl einer 5 M NaCl-Lösung und mehrmaliges Invertieren des Reaktionsgefäßes von der DNA entfernt. Die Proteine wurden durch Zugabe von 100 µl CTAB/NaCl-Lösung und Inkubation für 10 Min. bei 65 °C für eine Abtrennung im folgenden Extraktionsschritt komplexiert.

Im Verlauf der Extraktion wurde das Zell-Lysat zunächst mit 1 Vol. wasserfreiem Phenol ausgeschüttelt und zur Phasentrennung für 10 Min. bei 4 °C und 13000 UPM zentrifugiert (Zentrifuge: Jouan, BR4i, Rotor: AB 2.14; Jouan, Saint Herblain Cedex, F). Die wässrige Phase wurde abgenommen und im zweiten und dritten Extraktionsschritt mit 1 Vol.

Phenol:Chloroform:Isoamylalkohol (25:24:1) bzw. mit 1 Vol. Chloroform:Isoamylalkohol (24:1) ausgeschüttelt.

Der wässrige Überstand wurde in ein frisches ERG überführt. Die DNA-Fällung erfolgte durch Zugabe von 0,6 Vol. eiskaltem Isopropanol für 5 Min. bei -20 °C. Nach dem Abzentrifugieren der gefällten DNA (5 Min., 13000 UPM, 4 °C) wurde das DNA-Pellet mit eiskaltem, 70%igem Ethanol gewaschen, über Nacht unter dem Abzug getrocknet und in 35 µl TAE-Puffer (siehe Kap. II. 14.4) resuspendiert.

## 14.2 Bestimmung der DNA-Konzentration

Die Konzentrationsbestimmung von DNA-Lösungen wurde photometrisch, auf Basis der Absorptionseigenschaften von Nukleinsäuren bei Bestrahlung mit Licht einer Wellenlänge von 260 nm durchgeführt. Die Messungen wurden dabei mit Hilfe eines Nanoliter-Spektralphotometers (NanoDrop ND-1000, Peqlab, Erlangen) durchgeführt. Dieses Gerät misst die Absorption von Lösungen in einem Bereich von 220 bis 350 nm und berechnet daraus die DNA-Konzentration. Ein Quotient aus der Absorption bei 260 nm und 280 nm gibt Hinweise auf die Verlässlichkeit der berechneten DNA-Konzentration. Liegt dieser Quotient unter einem Wert von 1,8, so ist von einer starken Proteinkontamination der Nukleinsäurelösung auszugehen, was eine korrekte Bestimmung der Nukleinsäure-Konzentration stört. In diesem Fall wurde die Extraktion der DNA-Präparation aus Kapitel II. 14.1 wiederholt.

## 14.3 Polymerase-Kettenreaktion

Primer	Name	Sequenz (5' → 3')	Hersteller
Forwärtsprimer	Ihomp1_forw	GTG GAA GCG AGA GAG GTG G	Eurogenetic/Craiova (RO)
Rückwärtsprimer	Ihomp1_rev	TTA CGT GCT GAC GGA TAC GG	Eurogenetic/Craiova (RO)

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR, Mullis und Faloona, 1987, Saiki *et al.*, 1988) wurde in 0,2 ml ERG in einem Thermocycler der Marke Biorad (MyCycler™ Thermal Cycler; Biorad, München) durchgeführt. Der Standardreaktionsansatz (25 µl) enthielt: 1x Phusion HF-Reaktionspuffer (inklusive MgCl<sub>2</sub>: 1,5 mM), 0,5 Units Phusion DNA-Polymerase, je 0,2 mM Desoxynukleosidtriphosphate (dATP, dTTP, dCTP, dGTP), je 1 µM Vorwärts- und Rückwärtsprimer sowie 5 ng der jeweiligen DNA-Matze.

Die Spezifität der Primeranlagerung an die DNA-Matze (*Annealing*) ist temperaturabhängig und wurde im Verlauf der PCR über einen Gradient von 40 bis 65 °C getestet. Für die Amplifikation wurde folgendes Standardprogramm verwendet:

Standard PCR-Programm		Temperatur	Zeit
Initiale Denaturierung		98 °C	30 Sek.
30 Zyklen:	Denaturierung	98 °C	5 Sek.
	Annealing	40 - 65 °C	30 Sek.
	Synthese	72 °C	15 Sek.
Finale Synthese		72 °C	5 Min.

#### 14.4 Agarosegelektrophorese

<u>TAE-Puffer</u>	Tris/Acetat pH 8,0	10 mM
	EDTA	0,1 mM
<u>5 x Probenpuffer</u>	Ficoll 400	15 % (v/v)
	Na <sub>2</sub> EDTA	50 mM
	SDS	0,5 % (v/v)
	BPB	0,125 % (v/v)
	pH 8,0 - ergibt sich	

Die elektrophoretische Auftrennung von Nukleinsäuregemischen erfolgte auf einem 1%igem Agarosegel. Zur Herstellung der Gele wurden 1,25 g LE-Agarose in 125 ml TAE-Puffer aufgekocht, nach dem Abkühlen auf ca. 50 °C mit 20 µl einer 1 mg/ml Ethidiumbromid-Lösung (w/v in H<sub>2</sub>O<sub>millipore</sub>) versetzt, in eine horizontale Gelkammer (Biometra Horizon 58 Apparatur; Biometra, Göttingen) gegossen und mit einem entsprechenden Gel-Kamm versehen.

Die zu untersuchenden Proben wurden mit Probenpuffer (1 + 4, v/v) versetzt und direkt auf das Gel aufgetragen. Die Elektrophorese wurde unter Verwendung von TAE-Puffer als Laupuffer für ca. 90 Min. bei 120 V durchgeführt (Biometra Standard Power Pack P25; Biometra, Göttingen). Die Auftrennung der DNA wurde abschließend mit Hilfe eines UV-Leuchtschirmes detektiert und dokumentiert.

## 15 Mikroskopie

### 15.1 Lichtmikroskopie

Alle lichtmikroskopischen Untersuchungen wurden an einem Phasenkontrast-Mikroskop der Firma Zeiss (Zeiss Axioskop, Oberkochen) durchgeführt. Mit dieser Methode konnte sowohl der Zustand der Zellen als auch die Zelldichte im Verlauf der Inkubation in Kulturflaschen und Vorkulturen, im Rahmen der Fermentation und während der Präparation der Zellhüllen kontrolliert werden. Als Objektiv stand neben einem Luft-Objektiv (Vergrößerung: 40x, NA 0,75) auch ein Ölimmersionsobjektiv (Vergrößerung: 100x, NA 1,3) zur Verfügung.

Zur Bestimmung der Zelldichte wurde eine Thoma-Zählkammer (Brand, Dietenhofen) in Verbindung mit dem beschriebenen 40iger Objektiv verwendet. Die Gesamtzellzahl ist aufgrund des vorgegebenen Volumens der Kammer (0,02 mm x 0,0025 mm<sup>2</sup> pro Kleinstquadrat) nach folgender Formel zu bestimmen:

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

### 15.2 Elektronenmikroskopie

Die elektronenmikroskopischen Untersuchungen wurden an einem Gerät der Firma FEI (CM 12 Transmissionselektronenmikroskop, FEI & Co., Eindhoven, NL) durchgeführt. Zur digitalen Fotodokumentation diente eine Slow-Scan-CCD Kamera (TEM-1000, TVIPS-Tietz, Gauting) in Verbindung mit einem Microsoft Windows® gestütztem Anwendungsprogramm TCL-EM-Menü 3.0.

## 16 Immunlokalisation an Gefrierbrüchen

Im Vergleich zu den klassischen Gefrierbruch- und Schwermetallbedampfungstechniken ist der immunologische Nachweis von Biomolekülen auf Gefrierbrüchen zur Untersuchung von Auftreten und Verteilung entsprechender antigener Epitope vergleichsweise neu. Die Technik wird nach Fujimoto (1995) als *SDS-digested freeze-fracture replica labeling* (SDS-FRL) bezeichnet. Im Unterschied zu einem klassischen Verfahren werden die durch Schwermetallbedampfung erhaltenen Replikas nicht über Nacht auf einer 70%igen Schwefelsäure-Lösung abflottiert, sondern deutlich schonender für 2 h in einer 2,5%igen SDS-Lösung inkubiert. Auf diese Weise wird eine Erhaltung der antigenen Epitope für eine spätere Antikörpermarkierung erzielt. Analog zu der bereits beschriebenen Western-Blot-Technik (Kap. II. 6.3) erfolgt der immunologische Nachweis einzelner antigener Epitope mit Hilfe einer Kombination aus primärem und sekundärem Antikörper. Die Antikörpermarkierung

kann in der folgenden elektronenmikroskopischen Analyse der markierten Replikas über die an den sekundären Antikörper gekoppelten 6-nm-Goldpartikel verfolgt werden.

### 16.1 Probenvorbereitung

<u>SDS-Lösung</u>	Tris/HCl pH 8,3	10 mM
	SDS	2,5 % (v/v)
	Saccharose	30 mM

20 ml einer gut bewachsenen Kultur wurden auf ERG verteilt und durch eine schonende Zentrifugation für 10 Min. bei 2500 UPM (Tischzentrifuge 5417C, Eppendorf, Hamburg) aufkonzentriert. Um die native Struktur der antigenen Epitope für eine Immunlokalisation zu erhalten, wurden die Zellen nicht der üblichen chemischen Fixierung durch Glutaraldehyd unterzogen. Das gewonnene Zellpellet wurde in 5 µl Überstand resuspendiert und 1 - 2 µl auf spezielle Goldträger (Bal-Tec, Witten, Ruhr) pipettiert. Die Proben wurden anschließend durch kurzes Eintauchen in flüssigen Stickstoff kryofixiert und so in den Gefrierbruch eingesetzt.

### 16.2 Gefrierätzung und Schwermetallbedampfung

Die probenbeladenen Goldträger wurden mit Hilfe eines Probenhalters in die auf minus 175 °C vorgekühlte Bedampfungskammer CFE-50 (Cressington Ltd., Watford, UK; Kammerdruck: < 1 x 10<sup>-6</sup> mbar) eingeschleust und in einer entsprechenden Haltevorrichtung arretiert. Im Anschluss daran wurde der Probenhalter mit der Probe auf -97 °C erwärmt, um die Probe für den Gefrierbruch vorzubereiten. Nach 7 Min. bei -97 °C wurde die Probe mit der in einen höhenverstellbaren Messerblock integrierten, kohleverstärkten Rasierklinge im oberen Drittel gebrochen (3 bis 4 Wiederholungen) und das Oberflächenwasser auf den frisch gebrochenen Flächen absublimiert (Gefrierätzung). Als Kühlfalle diente dabei der über die Probe geschwenkte Messerblock (T= -175 °C). Die Dauer der Sublimation richtet sich nach der zu untersuchenden Probe. Pro Minute werden etwa 100 nm des Oberflächenwassers absublimiert. Vor dem Hintergrund der Zellgeometrie (Zelldurchmesser ca. 1,5 - 4 µm) wurde der Sublimationsschritt nach ca. 3½ Min. beendet.

Im Anschluss an die Sublimation wurde die gebrochene Probe mit einer 1 nm-dicken Platin-/Kohle-Schicht in einem Winkel von 45° bedampft. Diese Schrägbedampfung liefert den Kontrast für die spätere elektronenmikroskopische Analyse und gibt einen Eindruck über die Dreidimensionalität der Replika. Zur Stabilisierung des Platin-/Kohle-Films wurde in einem Winkel von 90° eine weitere, 10-nm-dicke Kohleschicht aufgebracht.

Nach dem Ausschleusen der bedampften Probe aus der Bedampfungskammer wurden die Replikas durch Abfletern auf einer SDS-Lösung (2 h, bei RT) von der biologischen Matrize gelöst und konnten so in den immunologischen Nachweis eingesetzt werden.

### 16.3 Immunologischer Nachweis

<u>PBS-Puffer</u>	NaCl	137 mM
	KCl	2,7 mM
	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	10 mM
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,8 mM
pH 7,2 - mit NaOH einstellen		
<u>PBG-Puffer</u>	PBS-Puffer	50 ml
	Gelatine	0,2 % (v/v)
	BSA	0,5 % (v/v)
pH-Wert ergibt sich		

Die durch die vergleichsweise schonende Ablösung der Replikas in der SDS-Lösung strukturell erhaltenen Antigene wurden durch die Inkubation mit diversen Puffer- und Antikörperlösungen immunologisch nachgewiesen. Sämtliche Schritte der SDS-FRL fanden bei RT und unter leichtem Schütteln statt. Der Austausch der verwendeten Lösungen erfolgte durch seitliches Absaugen mit Hilfe einer Pipette. Es wurde darauf geachtet, die Replikas nicht trockenfallen zu lassen, um unspezifische Antikörpermarkierungen zu verhindern.

Um sämtliches SDS aus dem System zu entfernen, wurden die abfleterten Replikas in PBS-Puffer gewaschen (4 x 10 Min.). Unspezifische Bindungsstellen für Antikörper wurden durch Zugabe einer Gelatine- und BSA-haltigen PBG-Lösung abgesättigt (1 h). Im Anschluss daran folgte die Inkubation in einer Lösung aus verdünntem primärem Antikörper (v/v in PBG) für mindestens 1 h. Um ungebundenen primären Antikörper zu entfernen, wurden die Replikas dreimal für jeweils 10 Min. in PBG gewaschen. Anschließend wurden die Replikas für 30 Min. mit einem mit 6-nm-Goldpartikeln gekoppelten, sekundären Antikörper inkubiert. In den folgenden Waschschritten wurden zunächst ungebundene sekundäre Antikörper (3 x 10 Min. PBG-Puffer) und anschließend überständige Gelatine und BSA (3 x 10 Min. PBS-Puffer) entfernt.

Zur Nachfixierung wurden die Replikas in 0,5 % Glutaraldehyd (frisch in PBS-Puffer verdünnt) für 5 Min. inkubiert und abschließend in H<sub>2</sub>O<sub>millipore</sub> gewaschen (2 x 2 Min.). Die markierten Replikas konnten auf beglimmte, nicht mit einem Kohlefilm beschichtete Kupferträgernetzchen (Agar, Hex 700 mesh, Plano, Wetzlar) aufgenommen werden und waren nach Lufttrocknung dauerhaft lagerbar. Die elektronenmikroskopische Analyse erfolgte wie bereits beschrieben (Kap. II. 15.2).

## III Ergebnisse

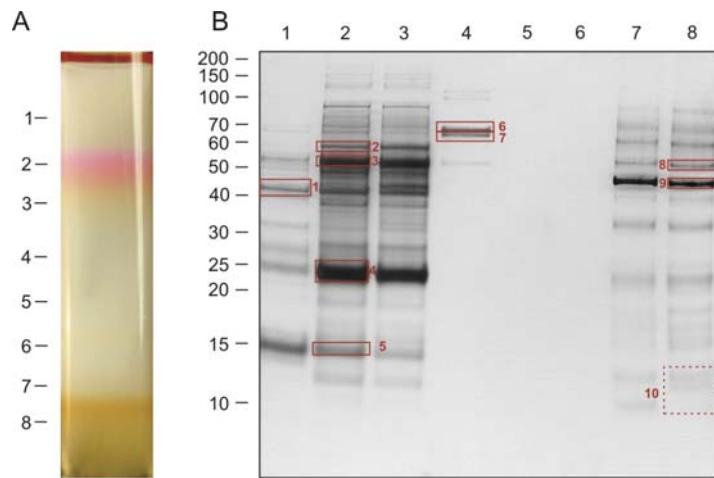
*Ignicoccus hospitalis* nimmt in vielerlei Hinsicht eine Sonderstellung in der Domäne der Archaea ein (Huber *et al.*, 2000; Paper *et al.*, 2007). Auffälligstes ultrastrukturelles Merkmal der Gattung ist dabei das Auftreten einer äußeren Membran, welche einen ungewöhnlich weiten, mit Vesikeln gefüllten, periplasmatischen Raum um die Cytoplasmamembran aufspannt (Rachel *et al.*, 2002; Junglas *et al.*, 2008). Das dominierende Protein dieser Membran, Ihomp1, (vormals Imp6 bzw. Imp1227) konnte bereits in früheren Arbeiten identifiziert werden (Burghardt, 2005; Burghardt *et al.*, 2007). Im Rahmen der einzigartigen, rein archaeellen und rein hyperthermophilen Lebensgemeinschaft zwischen *Ignicoccus hospitalis* und *Nanoarchaeum equitans* wird ein Metabolitenaustausch zwischen den Organismen unter Einbeziehung dieser äußeren Membran diskutiert (Huber *et al.*, 2002). Der Fokus der vorliegenden Arbeit lag auf einer eingehenden biophysikalischen und biochemischen Analyse der dominierenden Proteinspezies der äußeren Membran bezüglich einer möglichen Funktion im Rahmen des beschriebenen Austausches von Biomolekülen zwischen *I. hospitalis* und *N. equitans*. Zudem sollte eine umfangreiche massenspektrometrische Analyse der Membranfraktion der Rein- und Co-Kultur helfen, weitere, potenziell am Aufbau dieser Kontaktstelle beteiligte Proteine zu identifizieren.

### 1 Isolation der äußeren Membran von *Ignicoccus hospitalis* aus Rein- und Co-Kultur

Sowohl die *Ignicoccus*-Reinkulturen als auch die Co-Kultur aus *I. hospitalis* und *N. equitans* wurden in  $\frac{1}{2}$  SME Medium kultiviert, mit Erreichen der stationären Phase geerntet und in hypotonem Puffer resuspendiert (siehe Kap. II. 4 und Kap. II. 5).

Die Zellen wurden mechanisch durch Scherung aufgeschlossen und die so generierten Membranvesikel durch Dichtegradienten-Zentrifugation in einem kontinuierlichen Saccharosegradienten (8,5 % bis 70 %) aufgereinigt (Abbildung 8A). Diese Prozedur dient vor allem der Abreicherung von cytoplasmatischen Zellbestandteilen. Wie bereits durch elektronenmikroskopische Analysen nachgewiesen werden konnte, kommt es im Verlauf der Dichtegradienten-Zentrifugation zu einer Auffrennung des Zellhomogenates in cytoplasmatische Bestandteile (Abbildung 8; Fraktion 1 bis 4) und eine durch die äußere Membran dominierte Fraktion (Abbildung 8; Fraktion 7 und 8; Burghardt, 2005; Burghardt *et al.*, 2007). Sowohl im Falle der Reinkultur als auch bei Bearbeitung der Co-Kultur ist die Abtrennung der äußeren Membranen von Zellbestandteilen mit niedrigerer Dichte durch das Auftreten farbiger Banden im oberen Drittel bzw. am unteren Ende des Gradienten zu erkennen. Während die Farbgebung der cytoplasmatischen Fraktionen von grün nach rot variieren kann, ist die bräunliche Färbung der äußeren Membran im Verlauf der Dichtegradienten-

Zentrifugation ein Charakteristikum dieser Fraktion und erleichtert so deren Identifizierung und Gewinnung (Burghardt, 2005; Burghardt *et al.*, 2007). Um einen Einblick in die Proteinkonstitution der isolierten Fraktionen zu gewinnen, wurden diese in eine denaturierende SDS-PAGE eingesetzt und im elektrischen Feld entsprechend der Molekularmasse der Proteine aufgetrennt (Abbildung 8B).



**Abbildung 8: Isolation der äußeren Membran von *Ignicoccus hospitalis*.** (A) Saccharose-Dichtegradient nach Ultrazentrifugation bei 250.000 g für 2,5 h. Nummerierung auf der linken Seite beschreibt die isolierten Fraktionen und entspricht der Probenauftragung in der SDS-Page. (B) SDS-PAGE (10 % AA) der Fraktionen 1 bis 8 des Saccharosegradienten; rote Umräumungen und Nummerierung markieren die für die Proteinidentifikation ausgewählten Proteinbänder (siehe Kap. III. 2)

Während die Fraktionen 1 bis 3 des Saccharosegradienten ein komplexes Muster an Proteinbändern von 10 bis 150 kDa zeigen, wird die vierte Fraktion durch eine intensive Doppelbande mit einer Masse von etwa 60 kDa dominiert. Fraktion 5 und 6 sind frei von Proteinen, was die Qualität der Auftrennung im Saccharosegradienten unterstreicht. Die mit Hilfe elektronenmikroskopischer Analysen bereits eindeutig als membranhaltig identifizierten Fraktionen 7 und 8 weisen wiederum ein weites Spektrum an Proteinbändern mit Mobilitäten von 10 bis 100 kDa auf. Dominiert werden diese Spuren der SDS-PAGE durch eine Proteinbande mit einer Masse von etwa 45 kDa.

## 2 Charakterisierung des dominierenden Proteins der äußeren Membran von *I. hospitalis* - Ihomp1

### 2.1 Identifikation der dominierenden Proteine der Fraktionen der Membranpräparation

Eine Identifikation der dominierenden Proteinbanden der cytoplasmatischen und membranhaltigen Fraktionen der in Kapitel III. 1 beschriebenen Membranpräparation sollte Einblick in die Protein Zusammensetzung der Fraktionen des Saccharosegradienten geben.

Die Fraktionen wurden zunächst durch eine denaturierende SDS-PAGE aufgetrennt, die intensivsten Proteinbanden ausgewählt und je nach Identifikationstechnik durch Elektroblot oder Ausschneiden isoliert (Abbildung 8B, rote Markierungen).

Insgesamt wurden zehn Proteinbanden in die Analyse eingesetzt. Es wurden fünf Banden aus den nahezu identischen Faktionen 1 bis 3, welche das komplexeste Bandenmuster zeigten, eine Doppelbande von etwa 60 kDa aus Fraktion 4 sowie drei Banden der Membranfraktion (Faktionen 7 und 8) ausgewählt. Mit Ausnahme der Doppelbande (Banden Nummer 6 und 7), welche nach In-Gel-Verdau über MALDI MS/MS identifiziert wurde, konnten alle Proteine N-terminal ansequenziert werden (siehe Kap. II. 13). Mit Hilfe der so gewonnenen Daten ließen sich die untersuchten Proteinbanden eindeutig einzelnen proteinkodierenden Sequenzen im Genom von *I. hospitalis* (CDS) zuordnen. Tabelle 1 nennt die Protein-IDs der identifizierten Proteinspezies entsprechend der in Abbildung 8B getroffenen Bandennummerierung und gibt die Resultate der Recherchen mit dem Vorhersageprogramm Phobius und der NCBI-Proteindatenbank wieder. Eine detaillierte Auflistung der bioinformatischen Daten, der Ergebnisse der Datenbankabgleiche mit weiteren öffentlichen Datenbanken sowie der mutmaßlichen Funktionen aller im Rahmen dieser Arbeit identifizierten Proteine ist im Anhang zu finden (siehe Kap. VI. 2; Tabelle: *Kapitel III. 2.1 Dichtegradienten-Zentrifugation*).

Tabelle 1: Übersicht der identifizierten Proteine aus *I. hospitalis* nach Auftrennung des Zellhomogenates über Dichtegradienten-Zentrifugation (siehe Abbildung 8). [1] Protein-ID; [2] Auftreten eines Signalpeptides und Anzahl der vorhergesagten Transmembran-Helices (TMH) nach Phobius; [3] Annotation und bester Treffer des Datenbankabgleichs mit der NCBI-Proteindatenbank; [4] Signifikanz der Treffer: (1) N-Terminus bzw. Mascot Score und Anzahl der zugeordneten Peptide und Fragmente (Score / Nr. Peptide; Nr. Fragmente), (2) e-value / Sequenzidentität in % für den 1°hit; [5] mutmaßliche subzelluläre Lokalisation (C: cytoplasmatisch, M: membranständig, P: periplasmatisch, E: extrazellulär). \* e-value schlechter als 0,01

Nr.	[1]	[2]	[3]	[4]	[5]
1	Igni_0899	SP	FAD-dep. pyridine nucleotide-disulphide oxidored. 1° hit: hypothetical protein [NEQ024]	(1) (2)	N'-AKVVLG 3e-141 / 67 C
2	Igni_0985	SP + 3 TMH	hypothetical protein Igni_0985 1° hit: /	(1) (2)	N'-[GA]L[QE]I... * C/M
3, 4, 5	Igni_0459	/	Alkyl hydroperoxide red. / thiol specific antioxidant 1° hit: Peroxiredoxin family [Hbut_0228]	(1) (2)	N'-MPGQIPLI 1e-94 / 72 C
6	Igni_0096	/	Thermosome 1° hit: Thermosome alpha subunit [APE_0907.1]	(1) (2)	117 / 20; 0 0 / 73 C
7	Igni_0897	/	Thermosome 1° hit: Thermosome [Tpen_0693]	(1) (2)	357 / 21; 2 3e-170 / 57 C
8, 9	Igni_1266	1 TMH	hypothetical protein Igni_1266 1° hit: no Hit	(1) (2)	N'-GIGYTAL... no Hit M
10	Igni_1323	SP + 2 TMH	hypothetical protein Igni_1323 1° hit: /	(1) (2)	N'-XXANME... * M

Die fünf Proteinbanden der Fraktionen 1 bis 3 des Saccharosegradienten sind auf die Proteinspezies Igni\_0899 (Bande 1), Igni\_0985 (Bande 2) und Igni\_0459 (Bande 3, 4 und 5) zurückzuführen.

Die 40-kDa-Proteinbande der Fraktion 1 (Bande 1) konnte, basierend auf einer N-terminalen Sequenz von sieben Aminosäuren (N'-AKVVLG), eindeutig dem Protein Igni\_0899 zugeordnet werden. Bei einer Sequenzlänge von 367 Aminosäuren und der daraus für die CDS berechneten Molekulmasse von 41,05 kDa kann davon ausgegangen werden, dass es sich bei der im Gel markierten Bande (ca. 40 kDa) um die monomere Form des Proteins handelt. Das Genprodukt für igni\_0899 ist im Genom von *I. hospitalis* als *FAD-dependent pyridine nucleotide-disulphide oxidoreductase* annotiert. Durch eine Recherche in der NCBI-Proteindatenbank konnte zudem gezeigt werden, dass igni\_0899 die höchste Sequenzähnlichkeit zu dem hypothetischen Flavoprotein NEQ024 aus *N. equitans* zeigt (weitere Informationen zu Igni\_0899 siehe Kap. III. 3.1).

Im Falle der Proteinbande 2 konnte ebenfalls ein Protein aus *I. hospitalis* identifiziert werden. Obwohl der über Edman-Abbau ermittelte N-Terminus nicht exakt bestimmt werden konnte (N'-[GA]L[QE]IMLI), war eine eindeutige Zuordnung dieser Sequenz für eine CDS im *Ignicoccus*-Genom möglich. Das Gen igni\_0985 kodiert für ein hypothetisches Protein mit einer Molekulmasse von 15,428 kDa (138 AS), für welches in den Datenbanken durch

NCBI-Blast keine vergleichbare Sequenz bestimmt werden konnte. Ob es sich bei der in Abbildung 8B markierten Proteinbande mit einer Masse von über 50 kDa um eine oligomere Form von Igni\_0985 handelt, ist nicht geklärt. Durch die bioinformatische Analyse der Primärstruktur des Proteins mit Hilfe der Programme Phobius und TMHMM werden übereinstimmend ein Signalpeptid und drei Transmembran-Helices vorhergesagt. Derartige Sequenzstrukturen kennzeichnen in der Regel membranständige Proteine. Da es sich nach elektronenmikroskopischer Analyse bei Fraktion 2 nachweislich um eine cytoplasmatische Fraktion handelt, ist eine Aussage bezüglich der Lokalisierung von Igni\_0985 in der Zelle auf Grundlage der vorliegenden Daten nicht möglich.

Das Resultat einer Sequenzierung der Proteinbanden 3, 4 und 5 verwies jeweils auf den N-Terminus N'-MPGQIPLI, was auf verschiedene Dissoziationsformen ein und desselben Proteins in den untersuchten Proteinbanden des Gels hindeutet. Die berechnete Molekularmasse des identifizierten Proteins Igni\_0459 von 26,7 kDa (234 AS) entspricht in etwa der apparenten Masse der Proteinbande 4. Nachdem die Mobilität der Proteinbande 3 in der SDS-PAGE auf eine Masse von etwa 50 kDa schließen lässt, könnte es sich dabei um die dimere Form des Proteins handeln. Mit einer apparenten Masse von ca. 15 kDa ist die Mobilität des Proteins in Bande 5 gegenüber dem aus der Sequenz berechneten Wert deutlich erhöht. Eine mögliche Erklärung für diesen Befund ist eine artifizielle Degradierung des Proteins im Verlauf der Probenpräparation für die SDS-PAGE. Das Gen igni\_0459 kodiert nach Annotation für eine *Thioredoxin-Peroxidase*, ein Protein der Prx-Enzymfamilie. Es handelt sich bei Igni\_0459 um das am stärksten exprimierte Protein innerhalb der cytoplasmatischen Fraktionen des Saccharosegradienten (weitere Informationen zu Igni\_0459 siehe Kap. III. 3.1.1).

Wie durch elektronenmikroskopische Analysen gezeigt werden konnte, enthält die Fraktion Nummer 4 den Thermosomenkomplex von *I. hospitalis*. Entsprechend dazu konnten über MALDI MS/MS die beiden im Genom kodierten Thermosomen-Untereinheiten Igni\_0096 (Bande 6) und Igni\_0897 (Bande 7) identifiziert werden. Eine N-terminale Sequenzierung über Edman-Abbau war in diesem Fall, vermutlich aufgrund einer N-terminalen Blockierung, nicht durchführbar. Die Mascot Datenbankrecherche gegen die NCBI-Proteindatenbank ergab anhand der gewonnenen Peptidmassen und Fragmentspektren signifikante Scorewerte (signifikanter Score: >80; Kap. II. 13.2.1) sowohl für Igni\_0096 (Score: 117) als auch für Igni\_0897 (Score: 357). Eine genaue Zuordnung der Thermosomenuntereinheiten in eine Alpha- oder Beta-Untereinheit war jedoch aufgrund der hohen Sequenzähnlichkeit zwischen den Proteinen auf bioinformatischer Ebene nicht möglich.

Die Fraktionen 5 und 6 des Saccharosegradienten zeigten kein Proteinbandenmuster in der SDS-PAGE, wohingegen es sich bei den Fraktionen 7 und 8 nachweislich um die membranhaltigen Fraktionen des Gradienten handelte (Burghardt, 2005; Burghardt *et al.*,

2007). Die entsprechenden Spuren des SDS-Gels wiesen ein breites Bandenspektrum von 10 bis 100 kDa auf, aus welchem drei Banden für eine N-terminale Sequenzierung ausgewählt wurden. Wie in früheren Arbeiten bereits gezeigt werden konnte, entsprechen die Banden 8 und 9 zwei unterschiedlichen Dissoziationsstufen des ca. 6,23 kDa großen Proteins Igni\_1266, welches die dominierende Proteinspezies der Membranfraktion repräsentiert und stabile Homooligomere mit apparenten Massen von 45 und 50 kDa bildet. Durch N-terminale Sequenzierung zweier weiterer Proteinbanden mit Mobilitäten von 35 und 150 kDa konnten weitere Oligomerisierungsstufen des Ihomp1-Proteins nachgewiesen werden (nicht gezeigt; Burghardt *et al.*, 2007). Aufgrund einer Änderung der Protein-nomenklatur des *I. hospitalis* Genoms im Rahmen der Veröffentlichung in der NCBI-Datenbank wurde die Bezeichnung des Proteins geändert. Nachdem das Protein bereits als Imp6 und Imp1227 beschrieben wurde (Burghardt, 2005; Burghardt *et al.*, 2007), wurde mit "Ihomp1" (*Ignicoccus hospitalis* outer membrane protein 1) eine allgemeingültige und unabhängige Bezeichnung für das Genprodukt der proteinkodierenden Genomsequenz *igni\_1266* eingeführt (Burghardt *et al.*, 2008).

Im Rahmen der N-terminalen Sequenzierung der Proteinbande 10 konnte das Protein Igni\_1323 identifiziert werden (92 AS; MW 9,9 kDa), welches nach bioinformatischen Analysen mit den Programmen Phobius, TMHMM und SOSUI ein Signalpeptid und zwei Transmembran-Helices aufweist. Der bestimmte N-Terminus (N'-XXANMEANQ) entspricht dem dabei vorhergesagten N-Terminus (N'-AEANMEANQ) des prozessierten Proteins nach Abspaltung der Signalsequenz. Nach Annotation kodiert das Gen *igni\_1323* für ein hypothetisches Protein, für welches durch Sequenzabgleich mit der NCBI-Proteindatenbank keine signifikante Ähnlichkeit zu den in der Proteindatenbank enthaltenen Sequenzen nachgewiesen werden konnte.

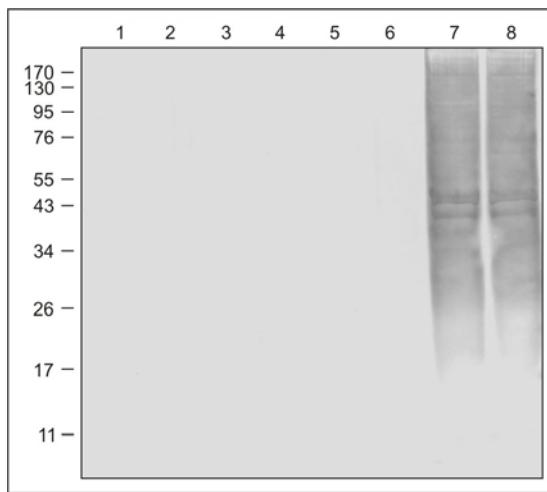
Im Fokus der folgenden Kapitel steht die biochemische und biophysikalische Charakterisierung des Proteins Ihomp1, der dominierenden Proteinspezies der Membranfraktion.

## 2.2 Lokalisation in *Ignicoccus hospitalis*

Um Aufschluss über die subzelluläre Lokalisation des Proteins Ihomp1 zu gewinnen, wurde ein immunologischer Nachweis anhand der gewonnenen acht Fraktionen der Membranpräparation durchgeführt. Für diesen Nachweis wurde eine Western-Blot-Analyse mit der in Abbildung 8B dargestellten SDS-PAGE durchgeführt. Nach Auftrennung der Proteine der einzelnen Fraktionen des Saccharosegradienten über SDS-PAGE wurden diese durch Elektroblot auf einen PVDF-Membran transferiert (Kap. II. 6.2 und Kap. II. 6.3.1).

Durch Inkubation mit einem spezifischen, polyklonalen anti-Ihomp1 Antikörper konnte gezeigt werden, dass dieses Protein ausschließlich in den membranhaltigen Fraktionen 7

und 8 enthalten ist (Abbildung 9). Während die Spuren 1 bis 4, welche den cytoplasmatischen Fraktionen des Saccharosegradienten entsprechen, keine Markierung mit dem Antikörper zeigten, konnte für die Spuren 7 und 8 ein starkes Signal über einen Bereich von 15 bis über 170 kDa detektiert werden. Trotz aufwendiger Optimierungsversuche war eine Reduzierung dieses unfokussierten Signals über nahezu die gesamte Gelstruktur der Fraktionen 7 und 8 nicht möglich. Mit hoher Wahrscheinlichkeit ist dieser Umstand auf das temperaturabhängige Oligomerisierungsverhalten von Ihomp1 zurückzuführen (Burghardt *et al.*, 2007). Auch in Abbildung 9 sind einige stärkere Signale zu erkennen. So sind beispielsweise die für das Protein charakteristischen 45 und 50-kDa Ihomp1-Oligomerbanden durch eine intensivere Markierung im Bereich zwischen 40 bis 50 kDa zu erkennen.



**Abbildung 9: Lokalisation von Ihomp1 in den Fraktion der Membranpräparation.**

Western-Blot der in Abbildung 8B gezeigten SDS-PAGE; Nummerierung der Gelstrukturen entspricht der Nummerierung der Fraktion des Saccharosegradienten; 1°AK: rabbit anti-Ihomp1 (1:10.000), 2°AK: goat anti-rabbit IgG + alkalische Phosphatase (1:5000)

Der immunologische Nachweis des dominierenden Proteins der Membranfraktion, Ihomp1, bestätigt die Integrität des Gradienten und die eindeutige Verteilung des Proteins innerhalb der Zelle. Nachdem Ihomp1 als membranspezifisch identifiziert werden konnte, stellt sich die Frage nach der Verbreitung des Proteins innerhalb der Gattung *Ignicoccus*.

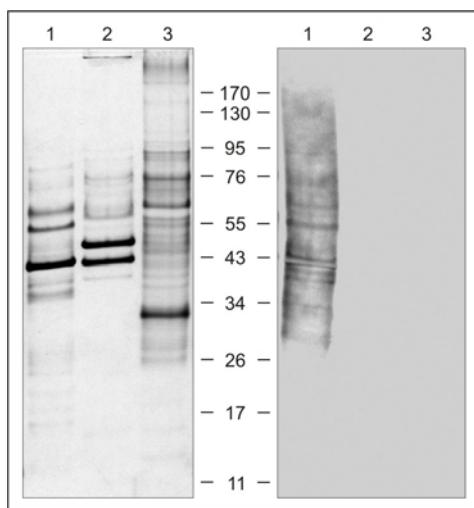
Elektronenmikroskopische Analysen an Ultradünnsschnitten haben gezeigt, dass *I. hospitalis* und *N. equitans* im Rahmen der Kultivierung in Co-Kultur in direkten Kontakt zueinander treten (Huber *et al.*, 2002; Junglas *et al.*, 2008). Vor dem Hintergrund der hohen Spezifität von *N. equitans* für *I. hospitalis* als Wirt, stellt sich die Frage nach der Proteinbeschaffenheit der Kontaktstelle und den daran beteiligten Strukturen. Ihomp1 als dominierendem Protein der Fraktion der äußeren Membran kommt in diesem Zusammenhang eine wichtige Rolle zu. Nachdem vergleichende SDS-PAGE-Experimente bereits erste Hinweise auf eine Wirtsspezifität von Ihomp1 ergaben (Burghardt, 2005), wurden Immunmarkierungsexperimente an präparierten Membranfraktionen und ganzen Zellen der anderen Spezies der Gattung *Ignicoccus* durchgeführt, um diesen vorläufigen Befund zu verifizieren.

## 2.3 Verbreitung innerhalb der Gattung *Ignicoccus*

Die Verbreitung des dominierenden Proteins der äußeren Membran von *I. hospitalis* innerhalb der Gattung *Ignicoccus* wurde durch zwei unabhängige Immunlokalisations-techniken untersucht: Zum einen anhand einer Western-Blot-Analyse der präparierten Membranfraktionen der unterschiedlichen Spezies der Gattung, zum anderen über die von Fujimoto etablierte SDS-FRL-Technik (Fujimoto et al., 1995), welche auf der Immunmarkierung an Gefrierbruchreplikas beruht. Des Weiteren sollte mit Hilfe entsprechender Primer die Verbreitung des korrespondierenden Gens *igni\_1266* innerhalb der Spezies Gattung durch eine spezifische Amplifikation des Gens mittels PCR analysiert werden.

### 2.3.1 Western-Blot Analyse

Die vergleichende SDS-PAGE der Membranfraktionen aus *I. hospitalis*, *I. islandicus* und *I. pacificus* zeigte neben deutlichen Unterschieden in der Protein Zusammensetzung der parallel gewonnenen Fraktionen auch ein eindeutiges Ergebnis bezüglich der Immunlokalisation von Ihomp1.



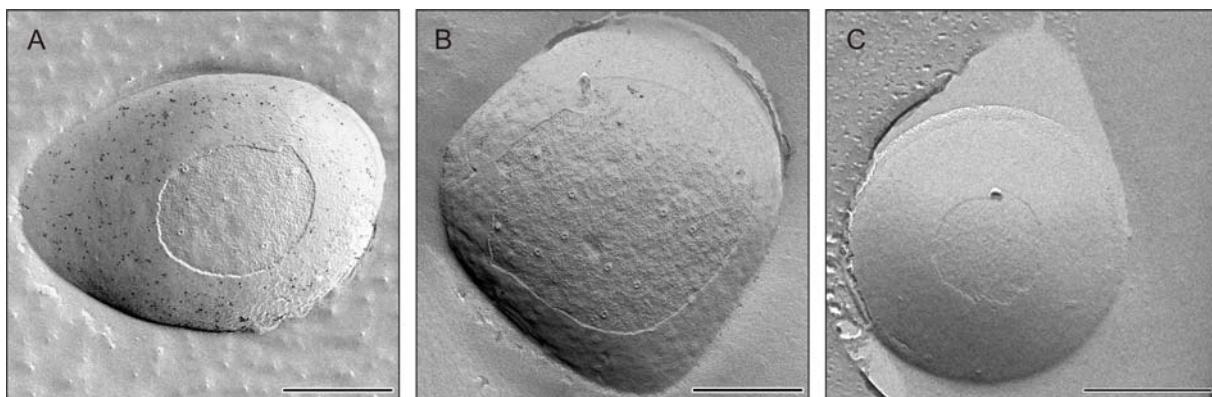
**Abbildung 10: Lokalisation von Ihomp1 innerhalb der Gattung *Ignicoccus* durch Western-Blot der entsprechenden Membranfraktionen.** (1) *Ignicoccus hospitalis*, (2) *Ignicoccus islandicus*, (3) *Ignicoccus pacificus*. Links: SDS-PAGE (10 % AA); Rechts: Western-Blot des in A gezeigten Geles, 1°AK: rabbit anti-Ihomp1 (1:10.000), 2°AK: goat anti-rabbit IgG + alkalische Phosphatase (1:5000)

Nach dem Transfer der Fraktionen auf eine PVDF-Membran und anschließender Western-Blot-Analyse (Abbildung 10) konnte nach Inkubation mit dem anti-Ihomp1 Antikörper lediglich in der Membranfraktion von *I. hospitalis* ein Signal detektiert werden (Kap. II. 6.3). Die Markierung tritt ebenso wie in Abbildung 9 über einen weiten Bereich der entsprechenden Gelspur auf und weist zudem distinkte Banden im Bereich um 43 und 55 kDa auf.

### 2.3.2 SDS - Freeze fracture replica labeling

Im Vergleich zu der in Abbildung 10 dargestellten Western-Blot-Analyse mit präparierten Membranfraktionen der einzelnen *Ignicoccus*-Spezies sind die Bedingungen, unter denen eine Immunmarkierung im Rahmen des SDS-FRL stattfindet, deutlich nativer. Die Zellen werden nach Kultivierung in  $\frac{1}{2}$  SME Medium durch schonende Zentrifugation aufkonzentriert, auf entsprechende Probenhalter geladen und mit Hilfe von flüssigem Stickstoff kryofixiert (siehe Kap. II. 16.1). Die so vorbehandelten, aufkonzentrierten Zellsuspensionen werden bei niedrigen Temperaturen im Vakuum einem Gefrierbruch mit anschließender Gefrierätzung und Schwermetallbedämpfung unterzogen (Kap. II. 16.2). Auf diese Weise werden die Zellen teilweise freigelegt und Abdrücke von deren Zelloberfläche angefertigt, welche für eine Immunlokalisierung verwendet werden können (Fujimoto *et al.*, 1995).

Abbildung 11 zeigt je einen solchen, als Replika bezeichneten Oberflächenabdruck pro *Ignicoccus*-Spezies nach Immunmarkierung mit einem anti-Ihomp1 Antikörper. Das Ergebnis dieses SDS-FRL Experimentes unterstreicht den durch Western-Blot gewonnenen Befund einer spezies-spezifischen Expression von Ihomp1.



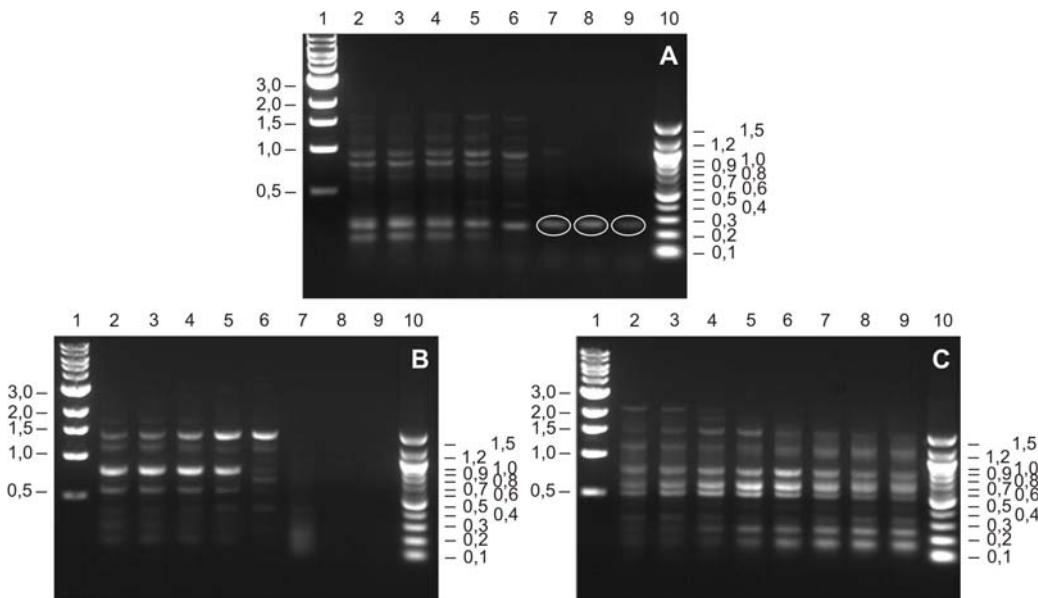
**Abbildung 11: Lokalisation von Ihomp1 innerhalb der Gattung *Ignicoccus* durch Immunmarkierung an Gefrierbruchreplikas der bekannten Spezies.** (A) *Ignicoccus hospitalis*, (B) *Ignicoccus islandicus*, (C) *Ignicoccus pacificus*; 1°AK: rabbit anti-Ihomp1 (A) 1:50, (B und C) 1:20, 2°AK: goat anti-rabbit IgG + 6nm Gold (A) 1:50, (B und C) 1:20; Balken: 1  $\mu$ m

Die in Abbildung 11 dargestellten Replikas zeigen zudem jeweils einen Bruch durch die Blätter der äußeren Membran, sodass im Zentrum der einzelnen Abbildungen ein Blick auf das innere Blatt des Bilayers möglich ist.

Trotz höherer Verdünnung des primären und sekundären Antikörpers im Vergleich zu *I. islandicus* und *I. pacificus* ist ausschließlich für *I. hospitalis* eine Markierung mit dem anti-Ihomp1 Antikörper in Form schwarzer Punkte erkennbar. Die zahlreichen Signale beschränken sich auf den Bereich des äußeren Blattes der äußeren Membran. Sowohl *I. islandicus* als auch *I. pacificus* weisen keine signifikante Markierung mit dem getesteten Antikörper auf, womit gezeigt ist, dass die Expression von Ihomp1 als dominierende Proteinspezies der *I. hospitalis* Zelloberfläche spezies-spezifisch ist.

### 2.3.3 PCR - Analyse

Eine Polymerase-Kettenreaktion (PCR) mit spezifischen Primern für das *Ihomp1*-Gen *igni\_1266* sollte Aufschluss über die Verbreitung des entsprechenden Gens innerhalb der Spezies der Gattung *Ignicoccus* geben. Dazu wurde die DNA der drei Stämme isoliert und jeweils mit den spezifischen Primern *Ihomp1\_forw* und *Ihomp1\_rev* für eine Amplifikation des Gens in eine PCR eingesetzt (siehe Kap. II. 14.1 und 14.3). Obwohl die optimale Hybridisierungstemperatur des verwendeten Primerpaars bei etwa 60 °C lag, wurde im Verlauf der PCR ein Gradient bezüglich der Hybridisierungstemperatur von 40 °C bis 65 °C getestet, um eine unspezifische Hybridisierung des Primerpaars an leicht voneinander abweichenden Sequenzen zu ermöglichen.



**Abbildung 12: Lokalisation des *Ihomp1*-Genes innerhalb der Gattung *Ignicoccus* durch spezifische Amplifikation der kodierenden Sequenz aus DNA-Isolaten der bekannten Spezies. *Ignicoccus hospitalis* (A), *Ignicoccus islandicus* (B), *Ignicoccus pacificus* (C); Spur 1 und 10 Längenstandards; Spur 2 - 9 Temperaturgradient (2: 40 °C; 3: 41,8 °C; 4: 44,8 °C; 5: 49,3 °C; 6: 55,2 °C; 7: 59,9 °C; 8: 63 °C; 9: 65 °C); weiße Ellipsen in (A) markieren das spezifische PCR-Produkt**

Die in Abbildung 12 dargestellte elektrophoretische Auftrennung der gewonnenen Amplifikate, getrennt nach Spezies, zeigt bei vergleichbarer Hybridisierungstemperatur jeweils unterschiedliche Bandenmuster. Das für *igni\_1266* zu erwartende PCR-Produkt einer Länge von 258 Basenpaaren kann nur im Falle von *I. hospitalis* in einer reinen Form detektiert werden und tritt ab einer Hybridisierungstemperatur von 60 °C bis 65 °C auf (Abbildung 12A; Spur 7 bis 9; weiße Ellipsen). Während nach elektrophoretischer Auftrennung für *I. islandicus* in diesem Temperaturbereich auf dem Gel keine Banden erkennbar sind, zeigt *I. pacificus* über den gesamten Temperaturgradienten hinweg ein gleich bleibend komplexes Bandenmuster (Abbildung 12B und C). Zwar sind in Abbildung 12C ebenfalls Banden im Bereich der beschriebenen Mobilität für das erwartete PCR-

Produkt erkennbar, diese sind jedoch aufgrund der gleich bleibend hohen Komplexität des Bandenmusters über den gesamten Temperaturgradienten nicht auf eine spezifische Amplifikation des *igni\_1266*-Gens zurückzuführen.

Eine Amplifikation des Gens *igni\_1266* aus *I. islandicus* oder *I. pacificus* war demnach unter den getesteten Bedingungen nicht möglich. Dies deutet auf signifikante Unterschiede bezüglich der Bindestellen für die spezifischen Primer hin. Es ist somit davon auszugehen, dass die Sequenz des Gens *igni\_1266* spezifisch für *I. hospitalis* ist.

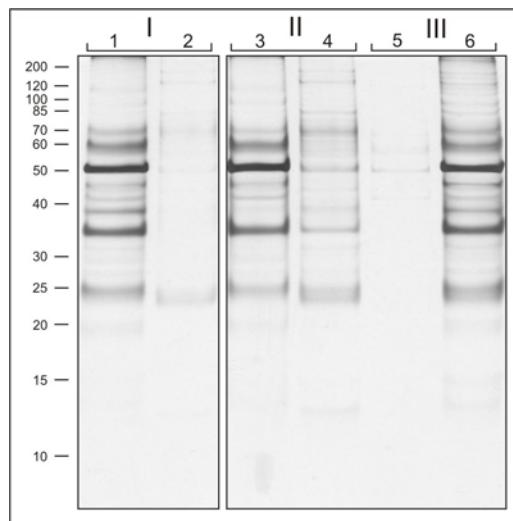
## 2.4 Native Proteinaufreinigung

Aufgrund des Fehlens geeigneter archaeeller Expressionssysteme (Zillig *et al.*, 1996; 1998; Albers *et al.*, 2006) wurde für die weiterführende Charakterisierung des Ihomp1-Proteins ein Protokoll für die native Aufreinigung der intakten Ihomp1-Komplexe aus der Dichtegradienten-Fraktion der äußeren Membran etabliert.

Im Vorfeld der chromatographischen Aufreinigung wurden die partiell hydrophoben, membranständigen Proteine und Proteinkomplexe der Fraktion durch Solubilisierung aus der Membran gelöst.

### 2.4.1 Solubilisierung der Proteine der Membranfraktion

Für die Solubilisierung der integralen Membranproteine der äußeren Membran von *I. hospitalis* wurde die entsprechende Fraktion des Saccharosegradienten (Abbildung 8A; Fraktion 7 und 8) nach Entfernung der darin enthaltenen Saccharose durch Dialyse mit einem Detergenz versetzt und unter verschiedenen Bedingungen inkubiert (Kap. II. 7). Da es sich bei der äußeren Membran der Gattung *Ignicoccus* nicht um eine äußere oder innere Membran im klassischen Sinne handelt, wurden verschiedene Detergenzien auf ihre Solubilisierungseffizienz getestet. Die effektivste Solubilisierung wurde bei Verwendung von 0,5 % des nichtionischen Detergenz n-Dodecyl-beta-D-maltopyranosid (DDM) im Anschluss an eine Inkubation für 1 h bei 25 °C unter Schütteln erzielt. DDM gilt als schonendes Detergenz, welches beispielsweise erfolgreich für die Solubilisierung von rekombinant erzeugten Membranproteinen aus der Cytoplasmamembran von *E. coli* zum Einsatz kommt (Voges und Jap, 1998; Bouhss *et al.*, 2004). Die in Abbildung 13 dargestellte SDS-PAGE zeigt das Ergebnis einer für die empirische Optimierung der Solubilisierungseffizienz durchgeführten Detergenz-Konzentrationsreihe. Im Anschluss an die Inkubation der Membranfraktion mit unterschiedlichen Konzentrationen an Detergenz wurden die solubilisierten Membranproteine durch Pelletierung nichtsolubilisierter Membran- und Zellreste durch Ultrazentrifugation getrennt (Kap. II. 7). Sowohl der Überstand als auch eine Probe des resuspendierten Pellets wurden anschließend für die Kontrolle der Solubilisierungseffizienz auf ein SDS-Gel aufgetragen.

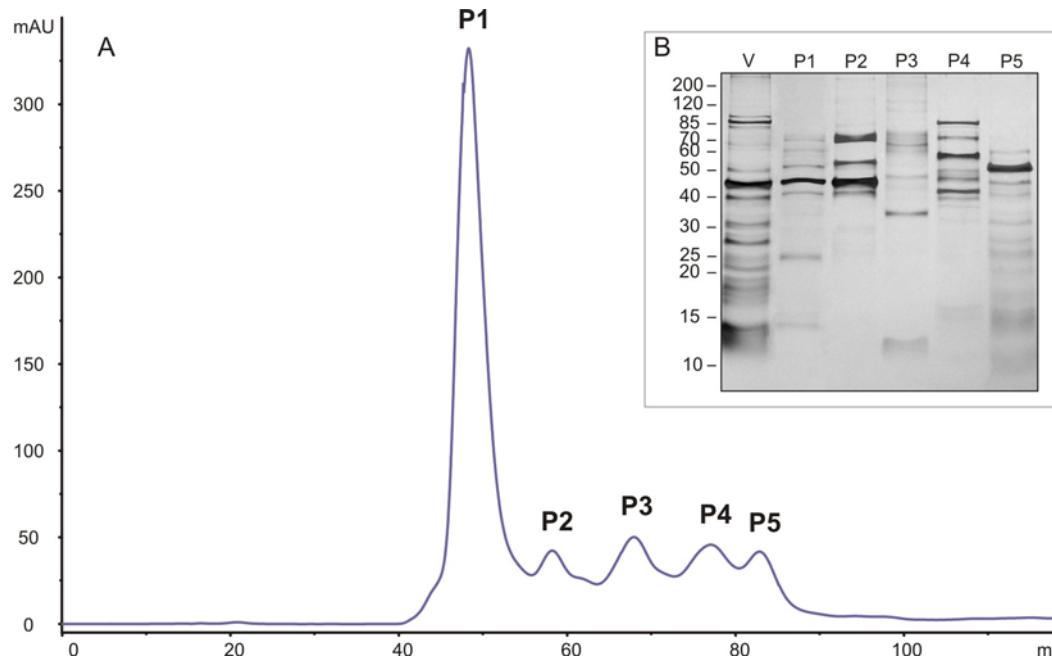


**Abbildung 13: Solubilisierung der integralen Membranproteine der äußeren Membran von *Ignicoccus hospitalis*.** SDS-PAGE (10 % AA) einer Dodecylmaltopyranosid-Konzentrationsreihe; Auftragung: Spur 1 bis 6 alternierend Pellet und Überstand nach Inkubation und Ultrazentrifugation des Solubilisierungsansatzes bei 100.000 g für 1 h; Ansatz I: Negativkontrolle ohne DDM, Ansatz II: Zugabe von 0,1 % DDM, Ansatz III: Zugabe von 0,5 % DDM

Es wurden drei Ansätze getestet, wobei der erste Ansatz als Negativkontrolle (I), d.h. ohne Einsatz von Detergenz, diente (Abbildung 13; Spur 1 und 2). Den Ansätzen II und III wurden, ausgerichtet an der Proteinkonzentration der Membranfraktion (X % DDM pro 1 mg/ml), 0,1 % bzw. 0,5 % DDM zugegeben. Wie der SDS-PAGE entnommen werden kann, führt die Zugabe von 0,1 % DDM bereits zu einem signifikanten Solubilisierungseffekt (Abbildung 13 Spur 4), welcher sich durch eine Steigerung der DDM-Konzentration auf 0,5 % auf nahezu 100 % erhöht (Abbildung 13 Spur 6). Obwohl diese empirisch bestimmte, optimale DDM-Konzentration von 0,5 % den Literaturwert für die kritische mizellare Konzentration (CMC) von DDM (0,0077 %) um ein Vielfaches übersteigt, wurde sie im Folgenden für sämtliche Analysen eingesetzt. Vergleichbar hohe Konzentrationen, mit Werten deutlich über der CMC, sind für dieses Detergenz in der Literatur weit verbreitet (Voges und Jap, 1998; Bouhss *et al.*, 2004).

## 2.4.2 Chromatographische Auftrennung der Proteine der Membranfraktion über Gelfiltration

Um die Komplexität der Membranfraktion von *I. hospitalis* in Bezug auf die Protein Zusammensetzung zu untersuchen, wurden die solubilisierten Membranproteine und -proteinkomplexe der Fraktion zunächst entsprechend ihrer Molekulargröße über eine Gelfiltrations-Chromatographie (GF) aufgetrennt (Kap. II. 8.2).

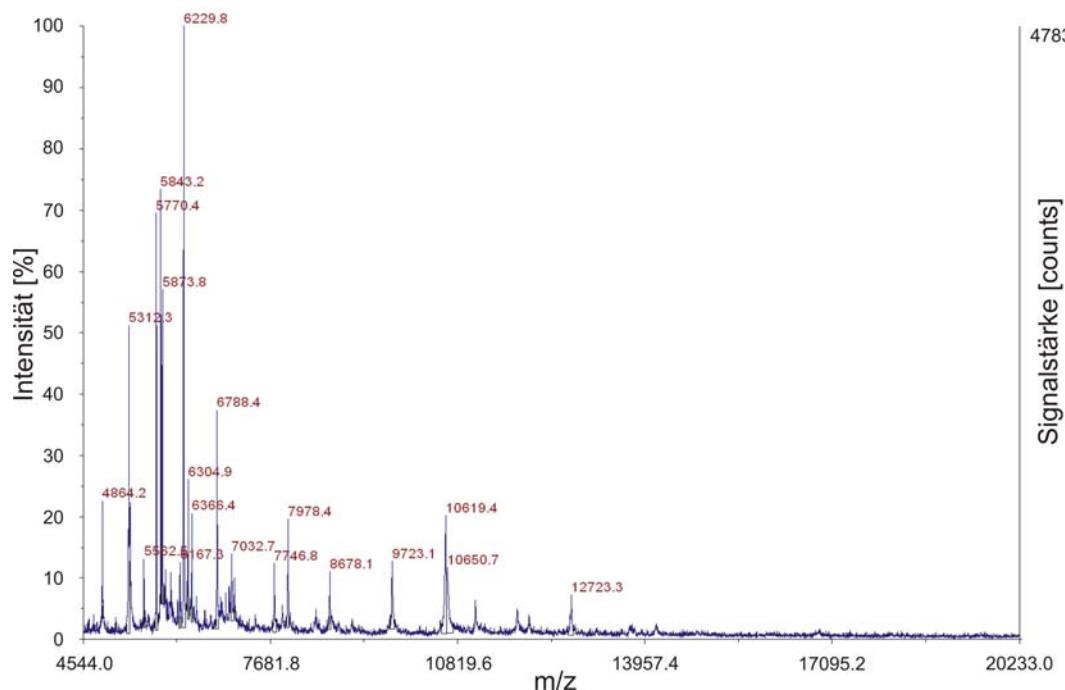


**Abbildung 14: Gelfiltration der Membranfraktion aus *Ignicoccus hospitalis*.** (A) Elutionsprofil der GF der Membranfraktion von *I. hospitalis*, Elutionsvolumen der Peaks 1 bis 5:  $V_{P1} = 48$  ml;  $V_{P2} = 58$  ml;  $V_{P3} = 68$  ml;  $V_{P4} = 77$  ml;  $V_{P5} = 83$  ml; (B) SDS-PAGE (10 % AA) der dominierenden Peaks, Auftragung: Membranfraktion vor der GF (V), Peaks der GF (P1 bis P5)

Das Profil der GF zeigt eine klare Trennung der Fraktion in fünf prominente Peaks (siehe Abbildung 14A). Durch die Auftragung einer Probe der Membranfraktion vor der gelchromatographischen Auftrennung und der entsprechenden Peak-Fraktionen der GF auf ein denaturierendes SDS-Gel konnte die Proteinkonstitution der Peaks dargestellt werden. Im Vergleich mit der Membranfraktion vor der GF zeigen die Peaks P1 bis P5 ein weniger komplexes Bandenmuster in der SDS-PAGE (Abbildung 14B). Die dominierende 45-kDa-Proteinbande der Membranfraktion konzentriert sich nach der chromatographischen Auftrennung in den Fraktionen der Peaks P1 und P2 auf. Durch eine massenspektrometrische Analyse der entsprechenden Bande über MALDI MS/MS konnte das Protein Ihomp1 eindeutig nachgewiesen werden. Während die Fraktionen P3 und P4 ein weites Bandenspektrum von 10 bis 200 kDa ohne prominente Banden zeigen, ist die Fraktion P5 vergleichbar zu P1 und P2 durch eine intensive Proteinbande im Massenbereich von 50 kDa

dominiert. Durch eine Kalibrierung der verwendeten GF-Säule konnte gezeigt werden, dass das Elutionsvolumen des Peaks P5 mit 83 ml in etwa dieser Masse entspricht. So beträgt das Elutionsvolumen des Eichproteins Ovalbumin (MW 45 kDa) etwa 82 ml. Eine Identifikation der 50-kDa-Proteinbande über MALDI MS/MS sollte eine mögliche Co-Lokalisation des Proteins Ihomp1 sowohl in den Fraktionen P1 und P2 als auch in der Fraktion P5 überprüfen. Wie die Analyse ergab, handelt es sich bei der 50-kDa-Bande der Fraktion P5 nicht um Ihomp1, sondern um das Protein Igni\_1150 (Elongationsfaktor; EF-1A), welches im Kapitel III. 3.1.1 näher beschrieben wird.

Somit ist die Lokalisation des aufzureinigenden Proteins Ihomp1 in den Peaks P1 und P2 nachgewiesen. Um Informationen über den Reinheitsgrad des Ihomp1-Proteins in der GF-Fraktion P1 zu gewinnen, wurde eine gesonderte massenspektrometrische Untersuchung der Gesamtfraktion, ohne SDS-PAGE und ohne In-Gel-Verdau, durchgeführt. Im Anschluss an die Entsalzung eines Aliquots der entsprechenden Fraktion P1 durch Dialyse wurden die Molekularmassen der in der Probe enthaltenen Proteinspezies durch eine massenspektrometrische Analyse im linearen Modus bestimmt (siehe Kap. II. 8.3). Im Folgenden konnte anhand der Anzahl und Intensität der erhaltenen Signale eine Aussage über den Reinheitsgrad der Probe getroffen werden. Abbildung 15 zeigt das Ergebnis der Reinheitskontrolle des Peaks P1 aus der in Abbildung 14 dargestellten GF.



**Abbildung 15:** Reinheitskontrolle der Fraktion P1 aus der Gelfiltration der Membranfraktion aus *Ignicoccus hospitalis* (siehe Abbildung 14). Die rote Peak-Beschriftung gibt das Masse-zu-Ladung-Verhältnis der korrespondierenden Peptide in Da an.

Das in Abbildung 15 dargestellte Massenspektrum der Reinheitskontrolle demonstriert die Intensität der gemessenen Signale entsprechend ihres Masse-zu-Ladung-Verhältnisses (m/z) in Form von Peak-Signalen. Die Intensität der Signale ist dabei von der Konzentration der in der Probe enthaltenen Peptid-/Proteinspezies abhängig. Das stärkste Signal, der so genannte Basispeak, wird mit einer relativen Signalintensität von 100 % angegeben (linke Y-Achse). Die übrigen Signale werden dazu in Relation gesetzt. Auf der rechten Y-Achse ist die Signalstärke in realen Werten, in *counts*, angegeben. Der Basispeak des in Abbildung 15 dargestellten Massenspektrums entspricht einer Masse von 6229,8 Da, was der Masse des prozessierten Ihomp1-Monomers nach Abspaltung der Signalsequenz entspricht (siehe Kap. III. 2.5). Das Auftreten von etwa zehn weiteren Signalen mit einer Mindestintensität von 20 % macht die Komplexität der gemessenen Probe deutlich. Auf diese Weise konnte gezeigt werden, dass die Trennleistung einer GF unter diesen Bedingungen für eine Aufreinigung von Ihomp1 nicht ausreicht.

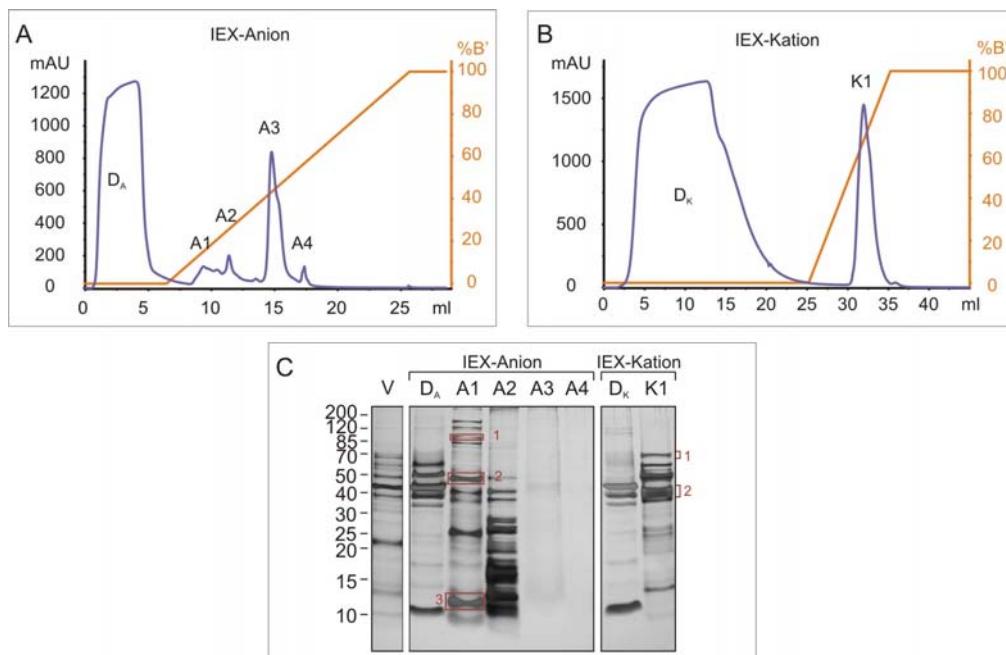
#### 2.4.3 Native Proteinaufreinigung

Wie durch die in Abbildung 15 dargestellte Reinheitskontrolle der GF-Fraktion P1 gezeigt werden konnte, genügt eine reine Gelfiltrations-Chromatographie nicht den Ansprüchen an eine qualitative Proteinaufreinigung von Ihomp1. Eine zusätzliche Affinitätschromatographie sollte durch Abtrennung anderer Proteine der Membranfraktion zur Optimierung der Aufreinigung des Ihomp1-Proteins beitragen.

Die dazu eingesetzte Ionenaustauscher-Chromatographie (IEX) beruht auf der reversiblen Affinität geladener Biomoleküle zu einer ebenfalls geladenen, stationären Phase im Inneren der Chromatographiesäule (Kap. II. 8.1). Diese Affinitäten sind unter anderem durch die Ionenstärke und den pH-Wert der verwendeten Puffer beeinflussbar, sodass eine gezielte Elution der gebundenen Moleküle möglich ist. Im Falle der Aufreinigung von Ihomp1 konnte selbst nach Verwendung unterschiedlicher Chromatographiemedien und Austestung diverser Pufferbedingungen keine Bindung des Proteins an die stationäre Phase der Säule erzielt werden. Jedoch wurden im Verlauf der Chromatographie diverse andere Proteinspezies auf der Säule zurückgehalten und so von Ihomp1 abgetrennt. Im Folgenden sollte durch den kombinierten Einsatz von Anionen- und Kationenaustauscher-Chromatographie eine möglichst umfangreiche Abreicherung von Proteinen aus der solubilisierten Membranfraktion von *I. hospitalis* erreicht werden. Durch eine anschließende Auftrennung des daraus gewonnenen Ihomp1-haltigen Durchlaufes über eine Gelfiltrations-Chromatographie sollte eine reine Fraktion von Ihomp1 gewonnen werden.

### Ionenaustauscher-Chromatographie

In Abbildung 16A ist das Profil einer Auftrennung der solubilisierten Membranfraktion aus *I. hospitalis* über Anionenaustauscher-Chromatographie (IEX-Anion) dargestellt. Das Profil ist dominiert durch die Fraktion  $D_A$ , welche den Durchlauf an ungebundenem Protein darstellt und vier, durch gezielte Elution mit Puffer B' erhaltene Peaks (A1 bis A4). Die so gewonnene Fraktion  $D_A$  wurde anschließend in eine Kationenaustauscher-Chromatographie (IEX-Kation) eingesetzt. Das daraus resultierende Chromatographie-Profil dieser Auftrennung ist in Abbildung 16B zu sehen. Zu erkennen ist eine stark absorbierende Fraktion im vorderen Bereich des Profils, welche den Durchlauf ( $D_K$ ) wiedergibt und wiederum ein, durch gezielte Elution gewonnener, intensiver Peak (K1).



**Abbildung 16: Auftrennung der Membranfraktion aus *Ignicoccus hospitalis* über IEX-Anion und IEX-Kation.** (A) IEX-Anion: Elutionsprofil der Membranfraktion von *I. hospitalis*; (B) IEX-Kation: Elutionsprofil der Fraktion  $D_A$  aus IEX-Anion; Konzentration von Puffer B' bei der Elution der Peaks:  $[B']_{A1} = 15\%$ ;  $[B']_{A2} = 26\%$ ;  $[B']_{A3} = 43,5\%$ ;  $[B']_{A4} = 57\%$ ;  $[B']_{K1} = 67\%$ ; (C) SDS-PAGE (10 % AA) der dominierenden Peaks der IEX-Anion und IEX-Kation, Auftragung: Membranfraktion vor IEX (V), Durchlauf der jeweiligen IEX ( $D_A$  und  $D_K$ ), Elutionspeaks der jeweiligen IEX (IEX-Anion: A1 bis A4; IEX-Kation: K1); rote Umrahmungen und Nummerierungen in (C) markieren die für die Proteinidentifikation ausgewählten Proteinbändern (siehe Kap. III. 3.1)

Eine Auftragung der solubilisierten Membranfraktion (V), der gewonnenen Durchläufe ( $D_A$  und  $D_K$ ) und der Peaks aus IEX-Anion und IEX-Kation auf ein denaturierendes SDS-Gel zeigte die Protein Zusammensetzung der Fraktionen und stellte sie einander gegenüber. Der Erfolg der Methode ist durch die in Abbildung 16C dargestellte SDS-PAGE deutlich zu erkennen. Die auffallend hohe Intensität der Proteinbänder in den Gelspuren der Peak-Fraktionen ist auf den starken Aufkonzentrationseffekt der Affinitätschromatographie

zurückzuführen und spiegelt nicht die tatsächlichen Konzentrationsverhältnisse in der Membranfraktion wieder. Wie die Peak-Fraktionen zeigen, konnte im Verlauf der Chromatographie eine hohe Anzahl an Proteinen durch Bindung an die Säule und anschließende gezielte Elution aus der Membranfraktion abgereichert werden, was in der fortschreitenden Reduktion der Komplexität der Durchlauf-Fraktionen resultiert.

Mit Hilfe der SDS-PAGE kann anhand der Lokalisation der 45-kDa-Proteinbande das Binderverhalten von Ihomp1 im Verlauf der IEX verfolgt werden. Wie bereits erwähnt, zeigt Ihomp1 keine Affinität zu den verwendeten Chromatographiemedien, weshalb die 45-kDa-Bande lediglich in den Spuren V, D<sub>A</sub> und D<sub>K</sub> nachgewiesen werden kann. Eine massenspektrometrische bzw. N-terminale Analyse ausgewählter Proteinbanden der Peak-Fraktionen (Abbildung 16C; rote Markierungen) vermittelte zudem einen Eindruck über die im Rahmen der Aufreinigung aus der Membranfraktion abgetrennten Proteine. Tabelle 2 nennt die Protein-IDs entsprechend der Bandennummerierung und eine mutmaßliche Funktion der Proteine. Eine detaillierte Auflistung der bioinformatischen Daten, der Ergebnisse der Datenbankabgleiche mit öffentlichen Datenbanken sowie der mutmaßlichen Funktionen aller im Rahmen dieser Arbeit identifizierten Proteine ist im Anhang zu finden (siehe Kap. VI. 2; Tabelle: *Kapitel III. 2.4 Native Proteinaufreinigung*).

Tabelle 2: Übersicht der identifizierten Proteine aus *I. hospitalis* nach Auftrennung der solubilisierten Membranfraktion über IEX-Anion und IEX-Kation. [1] Protein-ID; [2] Auftreten eines Signalpeptides und Anzahl der vorhergesagten Transmembran-Helices (TMH) durch Phobius; [3] Annotation und bester Treffer des Datenbankabgleichs mit der NCBI-Proteindatenbank; [4] Signifikanz der Treffer: (1) N-Terminus bzw. Mascot Score und Anzahl der zugeordneten Peptide und Fragmente (Score / Nr. Peptide; Nr. Fragmente), (2) e-value / Sequenzidentität in % für den 1°hit; [5] mutmaßliche subzelluläre Lokalisation (C: cytoplasmatisch, CM: cytoplasmamembranassoziiert).

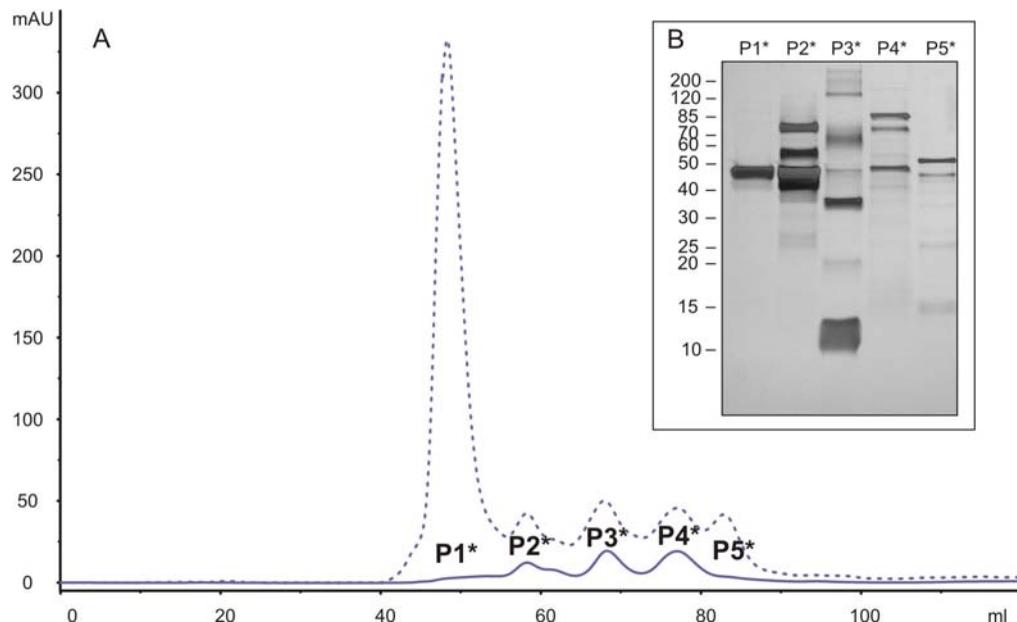
Nr.	[1]	[2]	[3]	[4]	[5]
A1; 1	Igni_0243	/	DNA-directed RNA polymerase, subunit A' 1°hit: DNA-directed RNA polymerase subunit alpha	(1) 209 / 32; 3 (2) 0 / 70	C
A1; 2	Igni_0132	/	Alcohol dehydrogenase 1°hit: Iron-containing alcohol dehydrogenase	(1) 144 / 9; 2 (2) 5e-75 / 40	C
A1; 3	Igni_0174	/	Nucleoid protein Alba 1°hit: DNA/RNA-binding protein Alba [Saci_1322]	(1) 241 / 6; 4 (2) 4e-32 / 7	C
K1; 1	Igni_1201	/	Solute binding protein-like protein 1°hit: Solute binding protein-like protein	(1) N'-GPGAK... (2) 1e-148 / 36	CM
K1; 2	Igni_0675	SP	Non-specific serine/threonine protein kinase 1°hit: Protein of unknown function RIO1	(1) N'-SEEEEX... (2) 5e-68 / 56	C

Mit Ausnahme des Proteins Igni\_1201, welches entsprechend seiner Funktionsbeschreibung als *Solute binding protein-like protein* zumindest als membrannahes Protein anzusehen ist, sind alle im Verlauf der Aufreinigung abgetrennten Proteine der Membranfraktion vermutlich cytoplasmatisch lokalisiert. Eine weiterführende Beschreibung des Bindepoteins Igni\_1201 ist in Kapitel III. 3.1.1 zu finden.

### Gelfiltration

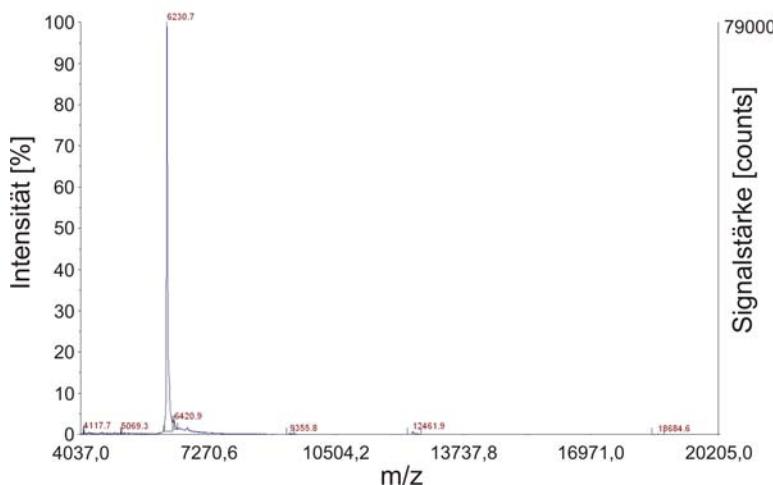
Der durch Vorauf trennung über eine kombinierte Ionenaustauscher-Chromatographie der Membranfraktion gewonnene Durchlauf der IEX-Kation,  $D_K$ , wurde analog zu Kap. III. 2.4.2 in eine Gelfiltrations-Chromatographie eingesetzt.

Abbildung 17A zeigt das Profil dieser Auf trennung in einer vergleichenden Darstellung mit der in Abbildung 14 gezeigten GF einer Membranfraktion ohne chromatographische Voraufreinigung. Anhand des Elutionsvolumens wurden analog zu den in Kap. III. 2.4.2 isolierten Peaks (P1 bis P5) fünf Fraktionen ausgewählt und für eine elektrophoretische Auf trennung in eine SDS-PAGE eingesetzt.



**Abbildung 17: Gelfiltration der Fraktion  $D_K$  aus der Voraufreinigung der Membranfraktion von *Ignicoccus hospitalis* über IEX-Anion und IEX-Kation.** (A) Elutionsprofil der GF der Fraktion  $D_K$  (durchgezogene blaue Kurve) und der Membranfraktion von *Ignicoccus hospitalis* ohne Voraufreinigung (gestrichelte blaue Kurve); Elutionsvolumen der Peaks 1 bis 5:  $V_{P1^*} = 48$  ml;  $V_{P2^*} = 58$  ml;  $V_{P3^*} = 68$  ml;  $V_{P4^*} = 77$  ml;  $V_{P5^*} = 83$  ml; (B) SDS-PAGE (10 % AA) der dominierenden Peaks, Auftragung: Peaks der GF der Fraktion  $D_K$  ( $P1^*$  bis  $P5^*$ )

Abbildung 17B zeigt eine SDS-PAGE der Peaks  $P1^*$  bis  $P5^*$  der gelchromatographischen Auf trennung der Durchlauf-Fraktion der IEX-Kation (Abbildung 16B, Fraktion  $D_K$ ). Im Vergleich der Fraktion  $P1^*$  zu der in Abbildung 14B dargestellten Fraktion P1 ist ein deutlicher Aufreinigungseffekt bezüglich des Ihomp1-Protiens (45-kDa-Bande) zu erkennen. Die in Abbildung 18 dargestellte Reinheitskontrolle der Fraktion zeigte neben einem intensiven Basispeak keine weiteren Massensignale, sodass es sich bei der getesteten Fraktion  $P1^*$  um eine nahezu 100 % reine Probe von Ihomp1 handelt (vgl. Abbildung 15).



**Abbildung 18: Reinheitskontrolle der Ihomp1-Fraktion P1\*.** Massenspektrum der Gelfiltrations-Fraktion P1\* aus Abbildung 17.

Auf diese Weise konnten im Verlauf eines mehrstufigen, chromatographischen Prozesses, ohne den Einsatz denaturierender Agenzien, aus der Zellernte eines 300 Liter Fermenters etwa 7 mg Ihomp1 in einer für die folgenden Analysen ausreichend reinen Form gewonnen werden.

## 2.5 Primärstrukturanalyse

Nach der Identifikation des Proteins Igni\_1266 bzw. Ihomp1 als dominierende und spezies-spezifische Proteinspezies der äußeren Membran von *I. hospitalis* sollte das Protein sowohl experimentell als auch mit Hilfe bewährter Vorhersagealgorithmen biochemisch und biophysikalisch charakterisiert werden.

Das im Genom von *I. hospitalis* enthaltene Gen *igni\_1266* umfasst 258 Basenpaare und kodiert nach Annotation für ein 85 Aminosäuren langes Protein unbekannter Funktion mit einer Masse von 8387 Da und einem berechneten isoelektrischen Punkt (pI) von 8,2 (siehe Abbildung 19). Eine experimentelle Bestimmung des pI, im Rahmen einer isoelektrischen Fokussierung, war für Ihomp1 nicht möglich, da derartige, partiell hydrophobe Proteine im Verlauf einer solchen Analyse irreversibel präzipitieren und somit nicht erfassbar sind (Santoni *et al.*, 2000; Klein *et al.*, 2005; Bunai und Yamane, 2005; Twine *et al.*, 2005).

1 MEAREVVEEMR RSRLLTG <del>GI</del> GYTAVIALAA LVLVMGALGL VLK <del>VAAAAGA</del>
51 LPSEVAKVAN ALPGLKASVD ANPAAGSLSS VSVST

**Abbildung 19: Aminosäuresequenz des unprozessierten Proteins Ihomp1.** Der durch Sequenzierung bestimmte N-Terminus des prozessierten Proteins ist durch Unterstreichung hervorgehoben. Negativ bzw. positiv geladene Aminosäuren sind blau bzw. rot, mögliche Translationsstarts grün markiert. Die hypothetische Transmembrandomäne ist grau hinterlegt.

Der über Edman-Abbau bestimmte N-Terminus des Proteins beginnt mit der Sequenz N'-GIGYTAVIALAALV und entspricht damit nicht dem N-Terminus des korrespondierenden Gens. Somit liegt die Vermutung nahe, dass für Ihomp1 ein Signalpeptid kodiert ist, welches in seiner Länge aufgrund zweier möglicher Translationsstarts nicht exakt angegeben werden kann (Abbildung 19). Nach Abspaltung der Signalsequenz ergibt sich für das prozessierte Protein eine Masse von 6230 Da bei einer Nettoladung von +1 und einem pl von 8,4.

Der experimentelle Befund eines Signalpeptides konnte mit Hilfe bioinformatischer Methoden bislang nicht bestätigt werden, was auf eine Reihe struktureller Besonderheiten der Signalsequenz sowie das ungewöhnliche Spaltmotives zurückzuführen ist. Es handelt sich um eine, mit 10 bis 18 Aminosäuren, vergleichsweise kurze Sequenz, welche in diesem Punkt an ein Klasse III (bzw. Typ IV Pilin-artiges) Signalpeptid erinnert (Albers und Driessen, 2002; Albers *et al.*, 2003). Eine zuverlässige Identifikation des Translationsstarts des Ihomp1-Gens, igni\_1266, ist auf Grundlage der Genomdaten gegenwärtig nicht möglich, da zwei verschiedene Methionine in diesem Sequenzabschnitt als N-Terminus in Betracht kommen. Im Rahmen einer Genomanalyse unter Verwendung des Vorhersageprogramms FlaFind, welches eine bioinformatische Identifikation von Klasse III bzw. Typ IV Pilin-artigen Signalpeptide auf Grundlage konservierter Sequenzmotive ermöglicht, widersprach einer Zuordnung der Signalsequenz zu dieser Gruppe.

Des Weiteren weist das Signalpeptid an Position 10 und 11 der Aminosäuresequenz zwei benachbarte Argininreste auf, was als Hinweis auf ein degeneriertes *Twin Arginin* Motiv gedeutet werden kann. Derartige Motive des Tat-Translokationssystems dienen der Adressierung gefalteter Proteinformen in der Zelle (Berks *et al.*, 2000; Albers *et al.*, 2003; Brüser und Sanders, 2003; Pohlschröder *et al.*, 2005). Eine diesbezüglich durchgeführte Recherche mit Hilfe des entsprechenden Vorhersagealgorithmus TatFind konnte ein solches Motiv in der Aminosäuresequenz des Ihomp1-Proteins nicht nachweisen.

Die beschriebenen, strukturellen Besonderheiten der Signalsequenz von Ihomp1 kommen auch bei Betrachtung des Spaltmotives zum Ausdruck. Ein vergleichbares Strukturmotiv der Schnittstelle für eine mutmaßliche Signalpeptidase (LTLG | GIGY) ist bislang nicht bekannt. Wie bereits erwähnt, weisen die Genomdaten für *I. hospitalis* keine Funktionsbeschreibung für Ihomp1 aus. Auch ein Datenbankabgleich mit der NCBI-Proteindatenbank, der PFAM-Datenbank zeigte keine Übereinstimmung mit bekannten Proteinspezies. Die vorläufig beschriebene *Outside - Inside* Orientierung für Ihomp1 (Burghardt, 2005), welche einen extrazellulär lokalisierten N-Terminus und einen periplasmatischen C-Terminus vorschlägt, konnte in der vorliegenden Arbeit unter Verwendung des Vorhersagealgorithmus HMMTOP bestätigt werden. Nachdem in früheren Arbeiten ein  $\alpha$ -helikales Sekundärstrukturmotiv in der Primärstruktur des Ihomp1-Proteins vorhergesagt werden konnte, sollte die Sequenz diesbezüglich eingehend untersucht werden, um diesen Befund experimentell zu verifizieren.

## 2.6 Sekundärstrukturanalyse

Für die Bestimmung der Sekundärstruktur von Ihomp1 wurden zum einen bioinformatische Analysen mit Hilfe ausgewählter Sekundärstrukturvorhersagealgorithmen auf Grundlage der Primärstruktur durchgeführt und zum anderen CD-Spektren im Fern UV-Bereich (185-260 nm) für eine spektroskopische Analyse aufgenommen.

### 2.6.1 Bioinformatischer Ansatz

Für die Vorhersage charakteristischer Sekundärstrukturelemente wurde die Primärstruktur des nicht prozessierten Ihomp1-Proteins mit Hilfe einer Reihe von *online*-basierten Suchalgorithmen analysiert. Die Untersuchung ergab übereinstimmend für alle getesteten Programme eine  $\alpha$ -helikale Transmembrandomäne, welche sich von Aminosäure 13 - 17 bis hin zur Position 39 - 41 erstreckt (vgl. Abbildung 19 und Tabelle 3). Weder die in Tabelle 3 aufgelisteten Vorhersagealgorithmen noch eine Recherche mit dem Strukturalignment-Programm Phyre deuteten auf einen signifikanten Anteil an  $\beta$ -Faltblattstrukturen hin.

Tabelle 3: Ergebnisse der Sekundärstrukturvorhersage für Ihomp1. In Klammern die Position der Strukturelemente in der Primärstruktur.

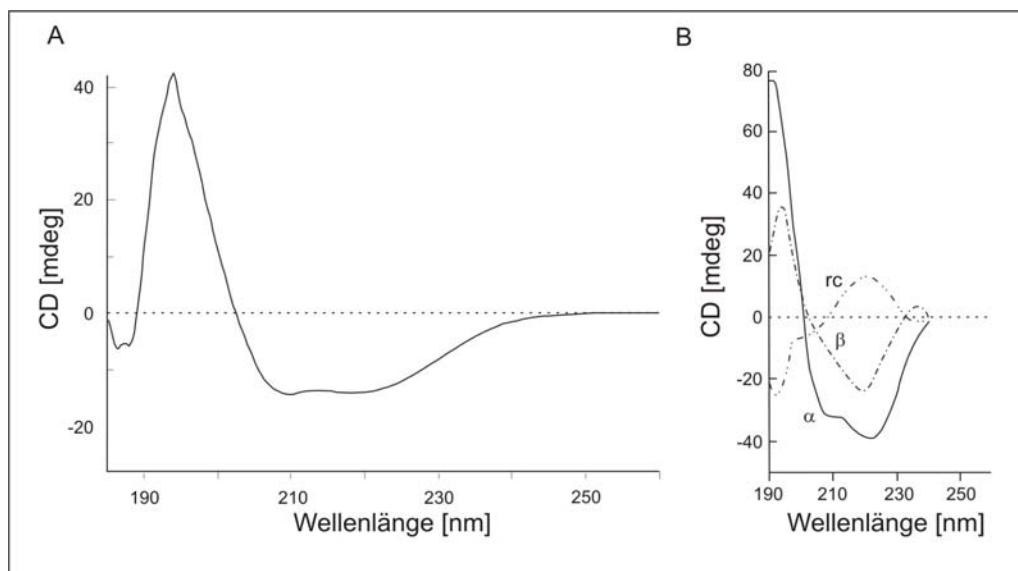
Algorithmen	$\alpha$ -Helix	$\beta$ -Faltblatt
TMHMM 2.0	+(17 - 39)	-
SOSUI	+(17 - 39)	-
MINNOU	+(16 - 39)	-
MaxSubSeq	+(13 - 41)	-
BETAPRO	+(13 - 40)	-

Zudem wurde die Sequenz in einen strukturbezogenen Abgleich mit der *online*-basierten Anwendung Phyre (Bennett-Lovsey *et al.*, 2008) eingesetzt. Dabei wird eine virtuelle Modellierung der Proteinsequenz durchgeführt, in deren Verlauf eine Anpassung der zu testenden Aminosäuresequenz an die derzeit in der Phyre-Datenbank hinterlegten, hochauflösten Proteinstrukturen angestrebt wird. Im Ergebnis dieses Abgleichs konnte jedoch keine signifikante, strukturelle Homologie zu den in der Datenbank enthaltenen 16.645 Faltungsformen ermittelt werden. Demnach handelt es sich bei dem Protein Ihomp1 um eine strukturell neuartige Proteinspezies, welche von den bestehenden Vorhersagealgorithmen eventuell nicht korrekt erfasst werden kann. Demzufolge wurde eine experimentelle Überprüfung der Sekundärstrukturvorhersage-Ergebnisse angestrebt.

## 2.6.2 Experimenteller Ansatz

Um die theoretischen Daten des bioinformatischen Ansatzes zu überprüfen, wurde eine experimentelle Sekundärstrukturanalyse durch CD-Spektroskopie anhand einer aufgereinigten Probe des Ihomp1-Proteins durchgeführt (Kap. II. 8).

Aufgrund der empfindlichen Messmethode war ein Austausch des Probenpuffers (MOPS pH 7,2 + 0,05 % DDM) gegen einen weniger stark mit dem CD-Signal interferierenden Phosphat-Puffer I nötig (Kap. II. 9). Das Fern-UV CD-Spektrum für Ihomp1 wurde anschließend über einen Wellenlängenbereich von 185 bis 260 nm an einem Jasco CD-Spektrometer in Schritten von 0,5 nm aufgezeichnet (Abbildung 20A).



**Abbildung 20: Sekundärstrukturanalyse für Ihomp1.** (A) experimentell bestimmtes Fern-UV CD-Spektrum von Ihomp1. Das Spektrum wurde in 10 mM Natriumphosphat-Puffer (pH 6,5) bei 25 °C aufgenommen. Die Schichtdicke der Küvette betrug 0,01 cm, die Protein-Konzentration 0,5 mg/ml. (B) Darstellung charakteristischer Fern-UV CD-Spektren (rc: Proteine ohne erkennbare Sekundärstruktur,  $\alpha$ :  $\alpha$ -Helix,  $\beta$ :  $\beta$ -Faltblatt).

Die Lage der charakteristischen Kurvenpunkte des in Abbildung 20A dargestellten CD-Spektrums für Ihomp1 ist typisch für Proteine mit überwiegend  $\alpha$ -helikalen Sekundärstruktur-Elementen (Stark, 1965; Johnson, 1990). Im Vergleich zu den spezifischen CD-Spektren für die klassischen Sekundärstrukturtypen (Abbildung 20B), zeigt Ihomp1 bei Bestrahlung mit Licht definierter Wellenlänge ein für  $\alpha$ -helikale Strukturen charakteristisches Absorptionsverhalten: Ein weites Minimum mit zwei Extremwerten (219 und 209,5 nm), einen späten ersten Nulldurchgang (202,5 nm), ein Maximum bei 194 nm und einen zweiten Nulldurchgang bei 189 nm (im Modell nicht gezeigt). Die experimentelle Analyse bestätigt somit die theoretischen Daten der bioinformatischen Sekundärstrukturvorhersage.

Mit Hilfe des Programms CDNN 2.1 und der serverbasierten Anwendung Dichroweb wurde das für Ihomp1 bestimmte Fern-UV CD-Spektrum quantifiziert. Dafür wurden die Messdaten des CD-Spektrums von 185 - 240 nm in einen Datenbankabgleich eingesetzt. Für die

Sekundärstrukturanalyse über CDNN 2.1 bzw. mit den über den Server zur Verfügung gestellten Algorithmen CDSSTR, CONTINLL, K2D und SELCON3 wurden die Messdaten mit Referenzdatensätzen verglichen, welche auf zum Teil hoch aufgelösten Proteinstrukturen unterschiedlicher Klassifikation beruhen. So konnte für Ihomp1 die in Tabelle 4 aufgelistete prozentuale Sekundärstrukturzusammensetzung bestimmt werden.

Tabelle 4: Durch Datenbankabgleich über CDNN 2.1 und Dichroweb Algorithmen bestimmte prozentuale Verteilung der Sekundärstrukturelemente in Ihomp1. Verwendete Referenzdatensätze: a) NNET 23; b) SP175; c) interner Datensatz; d) Referenzset 7.

Algorithmus / Datensatz	$\alpha$ -Helix [%]	$\beta$ -Faltblatt [%]	Rest [%]	NRMSD
CDNN 2.1 <sup>a</sup>	82	3	15	0,027
CDSSTR <sup>b</sup>	68	10	22	0,003
CONTINLL <sup>b</sup>	72	2	26	0,150
K2D <sup>c</sup>	79	0	21	0,111
SELCON3 <sup>d</sup>	83	-1	22	0,157
Durchschnitt	76,8 ( $\pm$ 9,79)	2,8 ( $\pm$ 1,87)	21,2 ( $\pm$ 5,15)	

Der jeweils angegebene NRMSD-Wert gilt als Bewertungskriterium für den Abgleich der experimentell gewonnenen Daten mit den durch die Algorithmen rekonstruierten Werten (Mao *et al.*, 1982). Dabei variieren die Grenzwerte je nach Algorithmus.

Alle Algorithmen lieferten im Rahmen des Abgleichs signifikante Resultate. Beispielsweise gelten im Falle des SELCON3 Algorithmus Ergebnisse ab einem NRMSD-Wert unterhalb von 0,25 als zuverlässig. Dieser Grenzwert wird, wie der Tabelle 4 zu entnehmen ist, mit 0,157 deutlich unterschritten. Abbildung 21 zeigt ein auf Basis dieses Algorithmus und des Referenzdatensatzes 7 (185 nm - 240 nm) rekonstruiertes CD-Spektrum im Vergleich zu den experimentellen Daten.

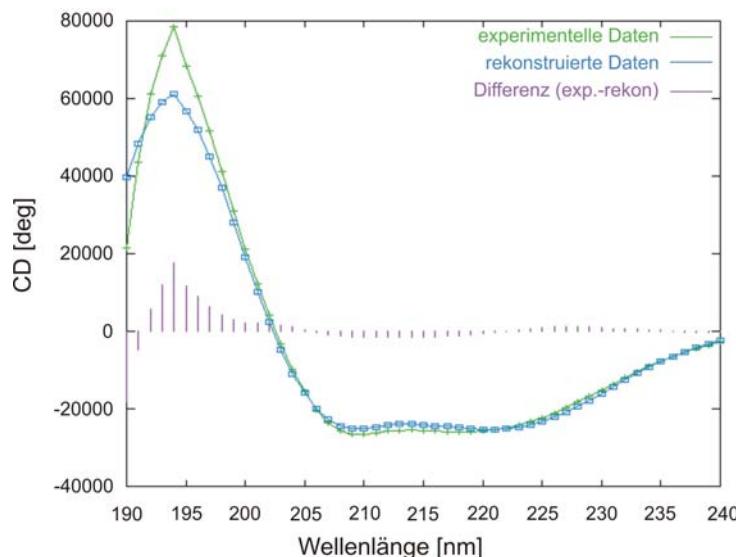
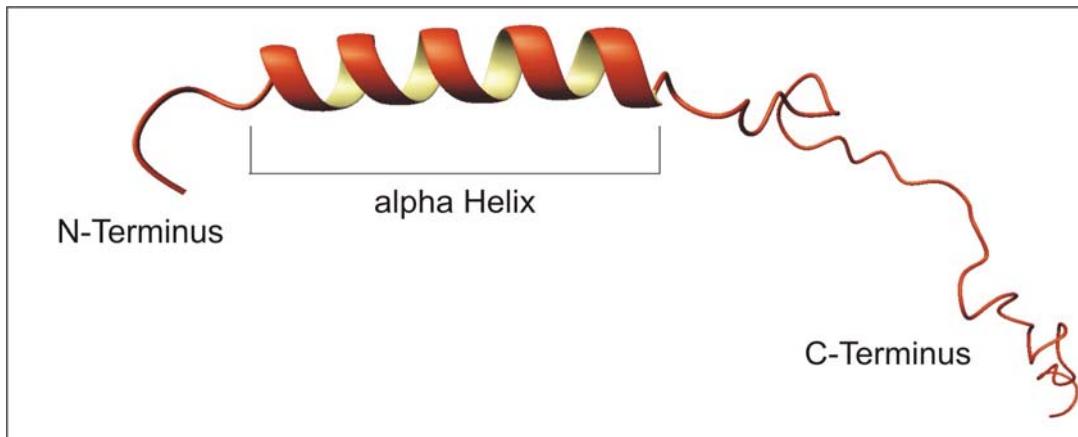


Abbildung 21: Rekonstruiertes CD-Spektrum für Ihomp1 auf Basis des SELCON3 Algorithmus.

Das gemessene Fern-UV CD-Spektrum für Ihomp1 (grün) überlagert sehr gut mit dem in blau dargestellten, rekonstruierten Spektrum. Die Differenz ist in der Nulllinie (violett) wiedergegeben und zeigt ausschließlich im Wellenlängenbereich unterhalb von 200 nm eine signifikante Streuung. Hintergrund dieser Abweichung könnte die Tatsache sein, dass dieser Bereich nur mit hohem technischem Aufwand exakt zu erfassen ist und demnach die gewonnenen Daten stark schwanken können. Der *NRMSD*-Wert für den Abgleich über SELCON3 unterstreicht mit 0,157 jedoch die Signifikanz dieser Ergebnisse (siehe Tabelle 4). Auf Grundlage der experimentellen Daten und mit Hilfe der über Sekundärstrukturvorhersageprogramme bestimmten Position der mutmaßlich  $\alpha$ -helikalen Transmembrandomäne des Proteins konnte ein Modell des Ihomp1-Monomers entworfen werden. Abbildung 22 zeigt eine perspektivische Seitenansicht des in Zusammenarbeit mit Dr. Wolfram Gronwald vom Institut für Biophysik und physikalische Biochemie der Universität Regensburg entworfenen Ihomp1-Modells.



**Abbildung 22: Model des Ihomp1- Monomers.**

Die mit Hilfe des Programms MolMol (Koradi *et al.*, 1996) erstellte Struktur zeigt die Lokalisation der 22 bis 27 Aminosäuren langen  $\alpha$ -Helix in der Sequenz des prozessierten Proteins. Es sei darauf hingewiesen, dass es sich lediglich um ein Modell zum Zwecke der Veranschaulichung handelt und auf diesem Wege keine Aussage über die Faltung des N- oder C-Terminus getroffen werden kann. Die dargestellte Variante ist eine von einhundert berechneten Möglichkeiten einer Faltung dieser Sequenzbereiche

## 2.7 Untersuchungen zu den Ihomp1-Komplexen

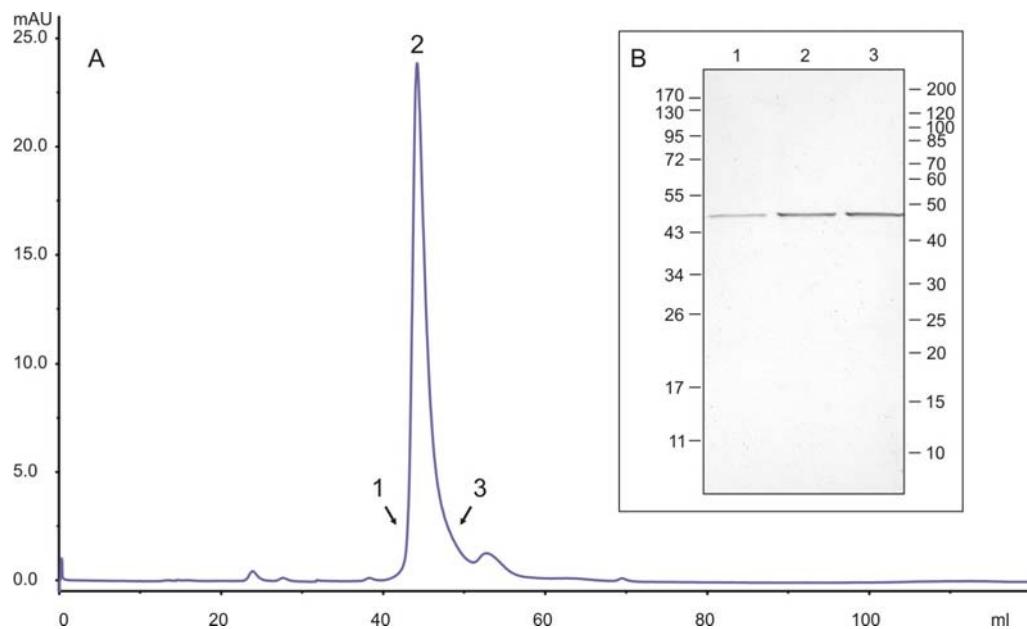
Wie bereits in früheren Arbeiten durch SDS-PAGE und Denaturierungstests gezeigt werden konnte, bildet das 6230 Da große Ihomp1-Protein oligomere Formen mit apparenten Massen von 45 und 50 kDa. Zudem konnten weitere Formen von 35 und 150 kDa nachgewiesen werden (Burghardt, 2005; Burghardt *et al.*, 2007). Die Proteinbanden von 45 bzw. 50 kDa, welche wahrscheinlich zwei Modifikationsformen eines Oligomertyps darstellen, dominieren jeweils die Bandenmuster der SDS-Gele und wurden als funktionelle Einheit einer Ihomp1-

Transmembranpore vermutet. Die 150 kDa-Bande wird als Trimer dieser Oligomerformen angesehen, während die 35 kDa-Form als Oligomer mit einer anderen Zusammensetzung zu verstehen ist.

Eine massenspektrometrische Untersuchung dieser Ihomp1-Komplexe über LILBID-MS sollte zunächst Aufschluss über die Stöchiometrie der 45 bzw. 50 kDa Ihomp1-Komplexe geben. Weiterführend sollte die Struktur und Geometrie der Komplexe über 3D-Kristallisation und Röntgenkristallstrukturanalyse bestimmt werden. Elektrophysiologische Einzelkanalstudien sollten zudem die Leitfähigkeit einer mutmaßlichen Ihomp1-Pore über künstliche Membranen nachweisen und gegebenenfalls quantifizieren.

### 2.7.1 Stöchiometrie

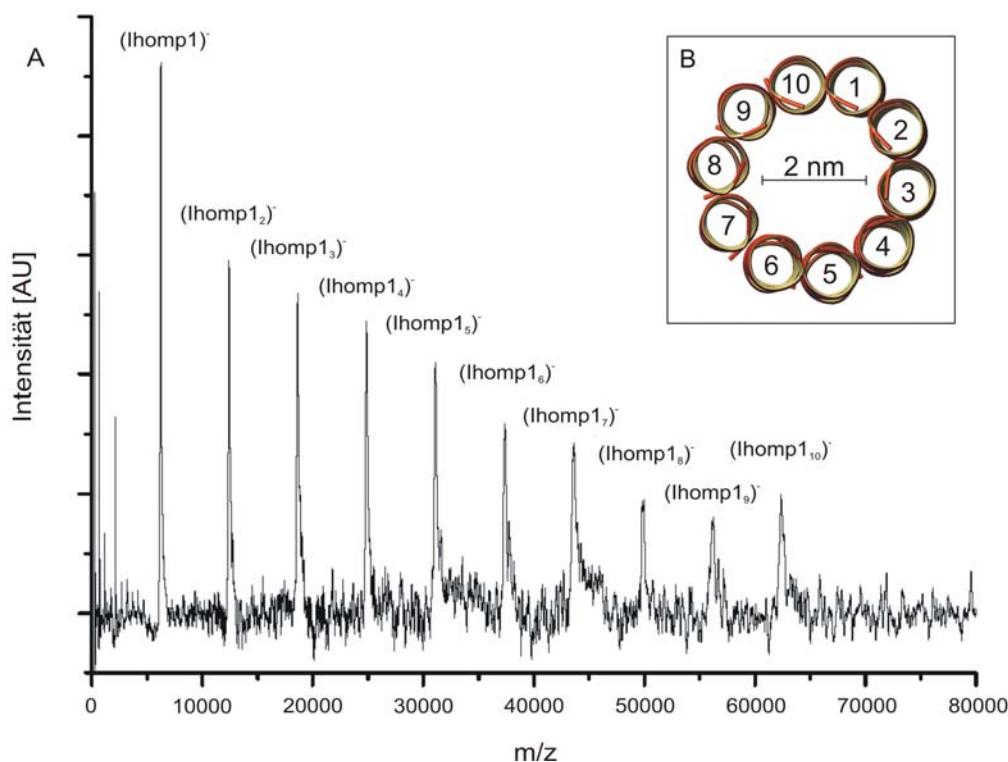
Für die massenspektrometrische Analyse der Stöchiometrie der Ihomp1-Komplexe wurde zunächst ein Aliquot der Fraktion P1\* der nativen Ihomp1-Aufreinigung (Kap. III. 2.4.3) durch Gelfiltrations-Chromatographie in ein salzfreies Milieu überführt (Kap. II. 10.1). Das in Abbildung 23A dargestellte Profil der entsprechenden GF zeigt einen schlanken Peak, was die Monodispersität der Probe in Bezug auf die unterschiedlichen Oligomerisierungsstufen des Ihomp1-Proteins unterstreicht. Eine SDS-PAGE ausgewählter Fraktionen sollte die Reinheit der Probe und die Molekularmasse der partiell dissozierten, stabilen 45- bzw. 50-kDa Oligomerform bestätigen (Abbildung 23B).



**Abbildung 23: Umpufferung der aufgereinigten Ihomp1-Fraktion P1\* für LILBID-MS.**  
(A) GF-Profil der Umpufferung; (B) elektrophoretische Auf trennung ausgewählter GF-Fraktionen.

Die elektrophoretische Auftrennung der in Abbildung 23 markierten GF-Fraktionen 1, 2 und 3 über eine denaturierende SDS-PAGE ergab mit jeweils einer 45-kDa-Proteinbande ein einheitliches Bandenspektrum. Die entsprechenden GF-Fraktionen wurden vereinigt, auf

eine Proteinkonzentration von 0,03 M aufkonzentriert und für die massenspektrometrische Analyse an die Universität Frankfurt a. M. (Abt.: Prof. Dr. B. Brutschy) übergeben.



**Abbildung 24: LILBID-MS-Spektrum eines "Ihomp1-Porenkomplexes".** (A) Massenspektrum des "Ihomp1-Porenkomplexes"; (B) Modell eines Ihomp1-Homodecamers.

Dort wurden durch die Intensivierung der Pulsennergie der Laserbestrahlung im Rahmen einer Thermolyse aus der oligomeren Form schrittweise monomere Untereinheiten entfernt und die Massen der dabei entstehenden Subkomplexe massenspektrometrisch erfasst. Voraussetzung für eine solche, laserinduzierte Dissoziation sind nichtkovalente Bindungen zwischen den Untereinheiten der vermessenen Oligomere. Kovalent verbundenen Komplexe können mit dieser Methode nicht analysiert werden (Kleinekofort *et al.*, 1996; Morgner *et al.*, 2006 und 2007).

Das korrespondierende Massenspektrum der LILBID-MS zeigt zehn äquidistante Signale, welche sich jeweils um einen m/z Wert von etwa 6,25 kDa unterscheiden (Abbildung 24A). Da dieser Wert in Näherung der Molekularmasse von Ihomp1 (6,23 kDa) entspricht, handelt es sich dabei um die Signale ganzzahliger Vielfacher des Monomers. Da die massenspektrometrischen Daten eindeutig auf eine nicht kovalente, homodecamere Struktur hinweisen, wurde das kürzlich publizierte Nonamermodell für den funktionellen Ihomp1-Porenkomplex (Burghardt *et al.*, 2007) revidiert.

Abbildung 24B zeigt ein Modell des Komplexes. Eine ringförmige Anordnung von 10 Ihomp1-Monomeren spannt eine Pore von etwa 2 nm auf, was dem Innendurchmesser der dominierenden 7-nm-Partikel der äußeren Membran von *I. hospitalis* entspricht (Burghardt, 2005, Burghardt *et al.*, 2007).

### 2.7.2 Röntgenkristallstrukturanalyse

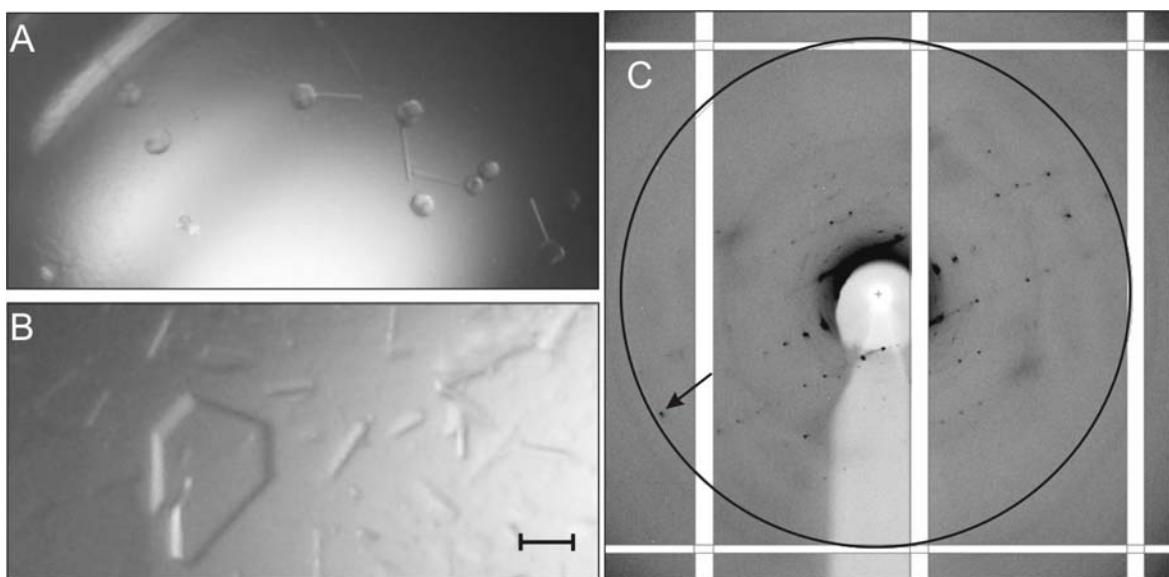
Wie durch stöchiometrische Analyse der Ihomp1-Komplexe gezeigt werden konnte, bildet das Ihomp1-Monomer stabile Homodecamere aus. Eine Röntgenstrukturanalyse sollte Aufschluss über die Dimensionen und die Geometrie der Komplexe geben und die Hintergründe der Protein-Protein-Interaktion zwischen den Monomeren aufklären.

Ein Aliquot der nativ aufgereinigten Ihomp1-Probe aus Fraktion P1\* (siehe Kap. III. 2.4.3) wurde an Dr. Caroline Peneff vom Biozentrum Basel übergeben, um dort die optimalen Kristallisationsbedingungen für Ihomp1 zu ermitteln. Die im sitting drop-Verfahren durchgeführten Experimente fanden bei RT im Nanolitermaßstab statt. Mit Hilfe eines Kristallisationsroboters wurden insgesamt 11 mg des reinen Proteins in unterschiedliche Kristallisationsansätze eingesetzt, bei denen in einem dreidimensionalen Screeningverfahren das Fällungsmittel (PEG; Konzentration und Molekulargewicht), der Reservoirpuffer (Puffersubstanz, Ionenstärke und pH-Wert) und das verwendete Detergenz (Typ und Konzentration) variiert wurden. Die Beugungsmuster der daraus hervorgehenden Protein-kristalle wurden anschließend von Dr. Caroline Peneff am SLS-Synchrotron des Paul Scherrer Instituts in Villigen (CH) aufgezeichnet.

Auf diese Weise konnten eine Reihe von Bedingungen ermittelt werden, unter denen die Ihomp1-Komplexe reproduzierbare, beugende Kristalle unterschiedlicher geometrischer Form ausbilden (Tabelle 5).

Tabelle 5: Auszug aus den getesteten Kristallisationsansätzen. Gezeigt sind Bedingungen unter denen beugende Proteinkristalle erhalten wurden. Je 0,2 µl bzw. 0,5 µl Reservoirlösung und Probe wurden bei RT im sitting Drop Verfahren eingesetzt. \* 0,2-µl-Ansatz; PEG-MME Polyethylenglycol-Monomethylether; OG n-Octyl-β-D-glucopyranosid; LDAO Lauryldimethylamin-N-oxid

Kristallisationsansatz	Kristallstruktur	Kristallisationsdauer	Auflösung
Reservoir: diverse Puffer; 30 % PEG 300 oder 400 Probe: 9 mg/ml Protein in MOPS-Puffer + 0,5 % DDM	Stäbchen mit Bulbus	1 - 3 Wochen	7 Å
Reservoir: 0,1 M Na-Aacetat pH 4,6; 25 % PEG 3000 Probe: 13 mg/ml Protein in MOPS-Puffer + 1 % OG	dünne Nadeln	1 Woche	10 Å
Reservoir: 0,1 M HEPES pH 7,5; 25 % PEG 6000 Probe: 9 mg/ml Protein in MOPS-Puffer + 1 % C8E4	dünne, fragile Platten	1 Woche	10 Å
Reservoir: 0,2 M I/M pH 6,0; 20 % PEG 4000 Probe: 13 mg/ml Protein in MOPS-Puffer + 1 % OG	dicke, kantige Kristalle	3 Wochen	12 Å
Reservoir: 0,1M MES pH 6,5; 25 % PEG 6000 Probe: 9 mg/ml Protein in MOPS-Puffer + 1 % C8E4	sehr kleine Stäbchen	3 Wochen	17 Å
Reservoir: 0,1 M Tris pH 7,0; 20 % PEG 2000 MME * Probe: 9 mg/ml Protein in MOPS-Puffer + 0,3 % LDAO *	flache, fragile Nadeln	1 Tag	20 Å
Reservoir: 0,2 M I/M pH 6,0; 20 % PEG 4000 Probe: 13 mg/ml Protein in MOPS-Puffer + 1 % OG	kantige Kristalle	3 Wochen	20 Å



**Abbildung 25: Ihomp1-Kristallisation und Vermessung der Kristalle.** Typische Ihomp1-Kristallformen: (A) Stäbchen mit Bulbusstruktur, (B) dünne fragile Platten und Nadeln, Balken = 1 mm; (C) Röntgenbeugungsmuster eines Kristalls aus (A), schwarzer Ring: entspricht einer Auflösung von 7 Å, schwarzer Pfeil: bester Beugungsreflex

Die am häufigsten auftretenden stabförmigen Kristalle, welche zugleich die besten Reflexe lieferten, wurden durch die Kristallisation von Ihomp1 in MOPS-Puffer (pH 7,2) + 0,05 % DDM, in Kombination mit dem Fällungsmittel PEG 300 (30 %; w/v) bzw. PEG 400 (30 %; w/v) erhalten. Abbildung 25A zeigt die aus einem Bulbus herauswachsenden, stabförmigen Kristalle im Vergleich zu einer weiteren, häufig auftretenden, plattenähnlichen Kristallform (Abbildung 25B).

Die bislang getesteten Kristallisationsbedingungen haben jedoch gezeigt, dass eine Kristallisation des Membranproteins unter diversen Bedingungen erzielt werden kann. Das Spektrum der Bedingungen erstreckt sich dabei über einen leicht sauren bis leicht basischen pH-Bereich und ist unabhängig von der Art des Pufferions. Der Austausch von DDM gegen andere Detergenzien zeigte keine gravierenden Auswirkungen auf die Kristallisationsdauer oder -form. Gegenwärtig werden weitere Bedingungen getestet, um die Auflösung der Röntgenbeugung zu optimieren und so eine hochauflösende Strukturaufklärung der nativen Ihomp1-Komplexe zu ermöglichen.

### 2.7.3 Elektrophysiologische Studien

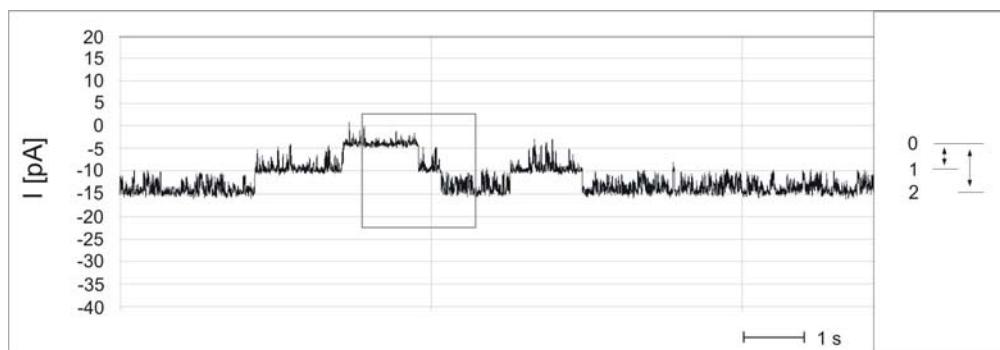
Mit Hilfe der elektrophysiologischen Einzelkanalstudien sollte eine mutmaßliche Leitfähigkeit der Ihomp1-Komplexe über künstliche Membranen nachgewiesen und gegebenenfalls quantifiziert werden (Kap. II. 12).

Gemessen wurde der Stromfluss in einem System aus zwei kommunizierenden Küvetten nach Anlegung diverser elektrischer Spannungen. Als Elektrolytlösung für die Messungen

diente eine KCl-Lösung (1 M KCl; unterschiedliche pH-Werte), welche in beide Küvetten vorgelegt wurde. Die Leitfähigkeit des Systems ergab sich aus dem Quotienten von gemessener Stromstärke und angelegter Spannung (Kap. II. 12). Nach dem Einfügen einer künstlichen Membran als Trennschicht zwischen den Küvetten wurde die Grundleitfähigkeit des Messsystems bestimmt. Um den Einfluss von Puffer und Detergenz auf die Messergebnisse zu testen, wurde die elektrische Stromstärke vor und nach Zugabe des entsprechenden Probenpuffers (MOPS-Puffer + 0,05 % DDM) unter Einwirkung unterschiedlicher Spannungen bestimmt. Auf diese Weise konnte gezeigt werden, dass das System nach dem Einbringen der künstlichen Membran und unter den getesteten Bedingungen keine signifikante Leitfähigkeit aufweist.

Für die elektrophysiologische Charakterisierung von Ihomp1 wurden in unterschiedlichen Experimenten 0,5 bis 2  $\mu$ l der Fraktion P1\* aus der nativen Aufreinigung des Proteins (siehe Kap. III. 2.4.3) sowie ein äquivalentes Volumen des Puffers zu den vorgelegten Elektrolytlösungen in jeweils eine der Küvetten pipettiert. Durch das Anlegen von elektrischen Spannungen im Bereich von  $\pm 20$  mV bis zu  $\pm 400$  mV wurde die Insertion der Ihomp1-Komplexe in die künstliche Membran forciert und der Vorgang durch das Aufzeichnen des Stromflusses im System verfolgt. Die Messungen des Membranstromes wurden bei RT in einem faradayschen Käfig durchgeführt. Meist erfolgte die Insertion der Komplexe durch das Anlegen hoher negativer Spannungen im Bereich von -120 bis -250 mV. Über den gesamten Spannungsbereich konnten so über 5200 Ein- und Ausbauereignisse der Ihomp1-Komplexe aufgezeichnet werden.

Abbildung 26 zeigt den Einfluss der Insertion einer bzw. zweier Ihomp1-Komplexe auf den Stromfluss im Messsystem bei einer konstanten elektrischen Spannung von -40 mV.

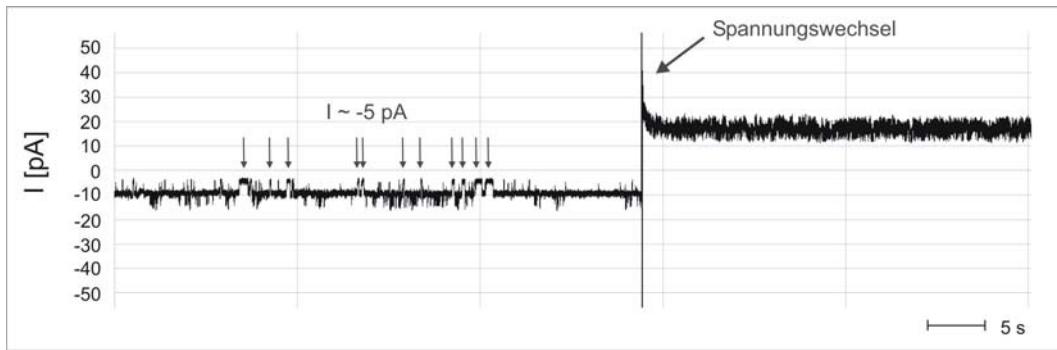


**Abbildung 26: Insertionsereignisse von Ihomp1-Porenkomplexen in künstliche Membranen.** Messprofil des Membranstroms mit Ein- / Ausbausignalen eines bzw. zweier Porenkomplexe bei konstanter Spannung ( $U = -40$  mV). Graue Umrahmung: siehe Text; Rechts: Anzahl der insertierten Komplexe.

Die stufenartige Änderung der Stromstärke um einen definierten Betrag von ca. -5 pA in Form von Blockamplituden (Abbildung 26; graue Umrahmung) beruht auf der Insertion der Ihomp1-Komplexe und ist damit Nachweis für die membrandurchspannende und porenbildende Funktion der Struktur.

Im Rahmen der elektrophysiologischen Einzelkanalstudien dieser Porenkomplexe wurde die Wirkung eines Spannungswechsels auf den Stromfluss im Messsystem in zwei Experimenten untersucht. Zum einen sollte eine Änderung der Polarität des Spannungsfeldes bei konstantem Spannungsbetrag Aufschluss über eine etwaige Polarität der Pore geben, zum anderen wurde der Einfluss einer schrittweisen Spannungserhöhung bei gleich bleibendem Vorzeichen auf den Membranstrom und damit auf die Leitfähigkeit der Pore bestimmt.

Im ersten Schritt wurde nach erfolgter Insertion eines Porenkomplexes der Stromfluss während eines Spannungswechsels vom negativen in den positiven Bereich aufgezeichnet. Wie das in Abbildung 27 dargestellte Messprofil zeigt, führt der beschriebene Spannungswechsel zum zeitweisen Verlust der Insertionsdynamik der Ihomp1-Komplexe und zu einem starken Verrauschen des Messsignals.

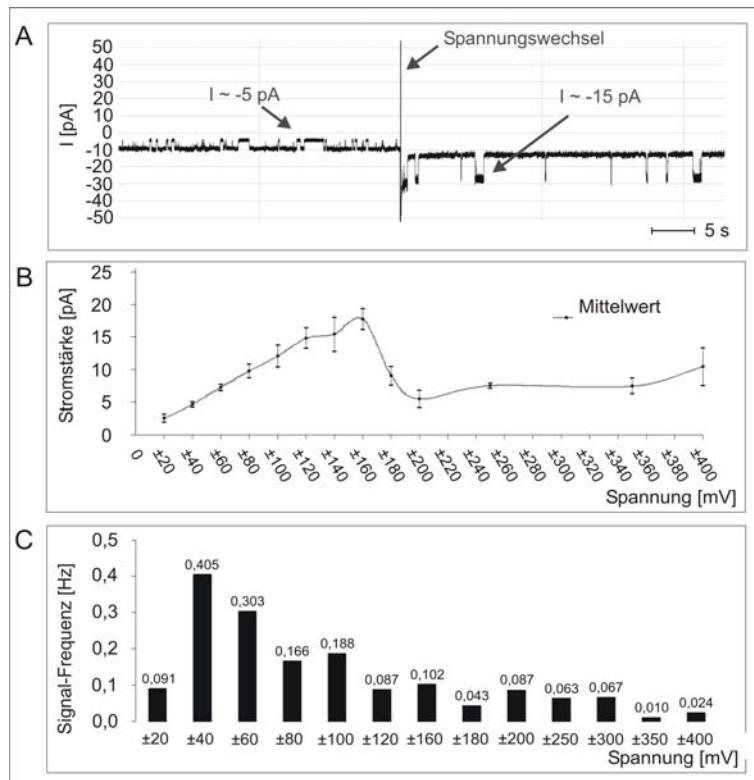


**Abbildung 27: Einzelkanalstudien am Ihomp1-Porenkomplex: Einfluss der Spannung auf das Messprofil des Membranstroms bei Wechsel der Polarität des Spannungsfeldes.** Einfluss eines Spannungswechsels vom negativen in den positiven Bereich bei gleichem Spannungsbetrag ( $\pm 40$  mV); graue Pfeile: Ein- / Ausbauereignisse.

Während vor dem Spannungswechsel im Durchschnitt etwa 0,4 Ereignisse pro Sekunde erfasst werden konnten (graue Pfeile), wurde das Messprofil des Membranstroms nach dem Wechsel unscharf und zeigte zunächst keine weiteren, auf eine Insertion verweisenden, stufenartigen Signale im Stromfluss. Das Signal kehrte jedoch nach wenigen Sekunden bis Minuten in Häufigkeit und Intensität in den Ausgangszustand zurück (nicht gezeigt). Der Betrag des Membranstroms sowie die Frequenz der Insertionsereignisse sind damit unabhängig von der Polarität des Spannungsfeldes. Die beschriebene Zeitverzögerung in Bezug auf den vorübergehenden Signalverlust deutet auf eine Ausrichtung der Porenkomplexe im elektrischen Feld hin, was auf eine gerichtete Polarität und Unidirektonalität der Pore schließen lässt. Somit ist das Vorzeichen der angelegten Spannung nicht entscheidend für die Intensität und Frequenz der Insertionsereignisse, da die Porenkomplexe in der Lage sind, sich entsprechend des elektrischen Feldes in der Membran anzuordnen.

In einem zweiten Experiment wurde der Einfluss des Spannungsbetrages auf das Messergebnis untersucht. Dazu wurde der Wert der elektrischen Spannungen schrittweise erhöht

und die entsprechenden Stromflüsse aufgezeichnet. Im niedrigen Spannungsbereich bis  $\pm 200$  mV wurden Intervalle von 20 mV, anschließend von 50 mV gewählt. Abbildung 28 zeigt beispielhaft in einem Messprofil die Auswirkung einer Spannungsänderung von -40 mV auf -120 mV und gibt in Form zweier Graphiken die Abhängigkeit der Signalintensität und Signalfrequenz vom Betrag der angelegten Spannung wieder.



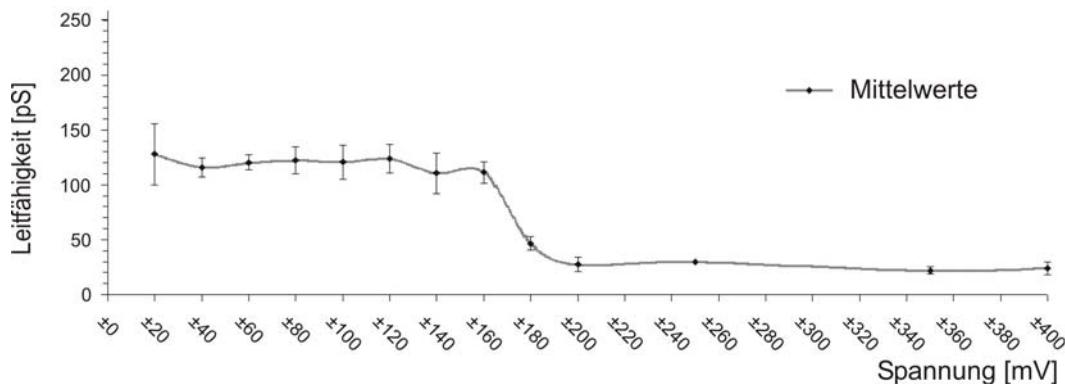
**Abbildung 28: Einzelkanalstudien am Ihomp1-Porenkomplex: Einfluss einer schrittweisen Spannungserhöhung auf den Wert des Membranstroms und die Frequenz der Insertionsereignisse.** (A) Messprofil des Membranstroms bei Spannungserhöhung mit gleich bleibendem Vorzeichen (-40 mV auf -120 mV). (B und C) Abhängigkeit der Signalintensität bzw. Signalfrequenz vom Betrag der Spannung ( $\pm 20$  bis  $\pm 400$  mV).

Beträgt die Signalintensität bei einer Spannung von -40 mV etwa -5 pA, steigt der Wert bei einer Erhöhung der Spannung auf -120 mV um das Dreifache (Abbildung 28A). Die Linearität des Spannungs-Stromstärke-Verhältnisses beschränkt sich auf einen Spannungsbereich von  $\pm 20$  bis  $\pm 160$  mV und gilt damit nicht für den gesamten Testbereich bis  $\pm 400$  mV (Abbildung 28B).

Bezüglich der Signalfrequenz ist eine vergleichbare, lineare Spannungsabhängigkeit nicht zu beobachten. Wie die graphische Darstellung in Abbildung 28C verdeutlicht, zeigt Ihomp1 mit einem Wert von 0,4 Hz ein deutliches Optimum bei einer Spannung von  $\pm 40$  mV. Im Vergleich dazu ist die Signalfrequenz bei einer Spannung von  $\pm 120$  mV mit 0,087 Hz bereits um den Faktor 4,5 geringer. Deutlich wird die Stellung dieses Optimums zudem bei Betrachtung der Signalfrequenz bei  $\pm 20$  mV. Der Wert ist mit 0,091 Hz ebenfalls um einen Faktor von etwa 4,5 niedriger als der Vergleichswert bei  $\pm 40$  mV. Demzufolge ist die

Häufigkeit der Ein-Ausbau-Ereignisse für die Ihomp1-Pore bei einer Membranspannung von  $\pm 40$  mV am höchsten.

Im Ergebnis der elektrophysiologischen Studien Ihomp1-Komplexe kann aus dem bestimmten Membranstrom im Verhältnis zu der angelegten Spannung eine durchschnittliche Leitfähigkeit von 120 pS über den Spannungsbereich von  $\pm 20$  bis  $\pm 160$  mV berechnet werden (Abbildung 29).



**Abbildung 29: Einzelkanalstudien am Ihomp1-Porenkomplex, Einfluss der angelegten Spannung auf Stromstärke und Leitfähigkeit.**

Der abrupte Abfall der Leitfähigkeit bei Erhöhung der Spannung auf Werte von über  $\pm 160$  mV verdeutlicht die physiologischen Grenzen der Pore und unterstreicht den biologischen Hintergrund der Untersuchung. Die Verwendung unterschiedlicher Elektrolytlösungen mit pH-Werten von 5,5 bis 7,5 zeigte keinen Effekt auf die Leitfähigkeit der Pore und ist hier nicht dargestellt.

### 3 Proteinanalytik der Rein und Co-Kultur

#### 3.1 Untersuchungen der Reinkultur

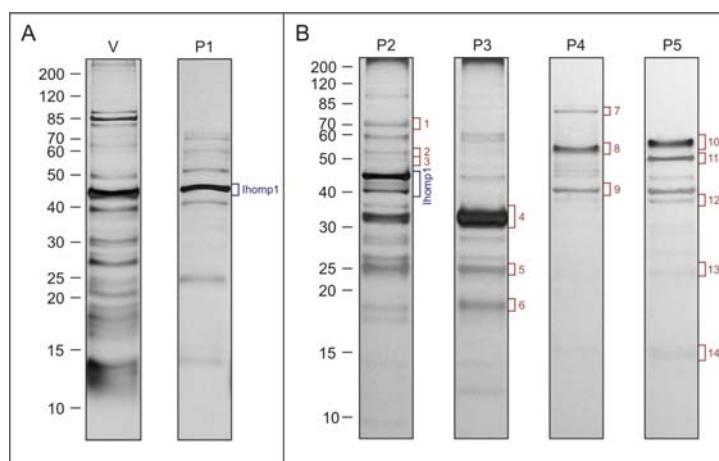
Die elektronenmikroskopische Analyse der Ultrastruktur der äußeren Membran von *I. hospitalis* zeigte neben den dominierenden 7-nm-Partikeln einen zweiten, weniger stark verbreiteten Strukturtyp mit einem Gesamtdurchmesser von 24 nm (Rachel *et al.*, 2002; Näther und Rachel, 2004). Während durch Immunmarkierungsstudien an Ultradünnschnitten und Gefrierbrüchen gezeigt werden konnte, dass die 7-nm-Partikel auf das dominierende Protein der äußeren Membran, Ihomp1, zurückzuführen sind (Burghardt *et al.*, 2007), ist der Ursprung der 24-nm-Komplexe bislang ungeklärt. Vor dem Hintergrund der Fragestellung, welche Proteine in den Aufbau dieser und anderer Komplexe der Zellhülle involviert sind, sollte die Proteinkonstitution der Fraktion der äußeren Membran analysiert werden. Dazu wurde die Isolation der Fraktion der äußeren Membran von *I. hospitalis*, wie in Kapitel II. 5 beschrieben, durchgeführt.

### 3.1.1 Gelchromatographische Auftrennung und massenspektrometrische Analyse der Zellhüllfraktion

Im Anschluss an die Dichtegradienten-Zentrifugation und die Isolation der entsprechenden, membranhaltigen Fraktion (siehe Kap. III. 1) wurde diese gegen MOPS-Puffer dialysiert und nach Zugabe von 0,5 % DDM für 1 h bei 25 °C inkubiert. Aufgrund der Komplexität der Probe wurden die so solubilisierten Proteine und Proteinkomplexe unter nicht denaturierenden Bedingungen entsprechend ihrer Molekularmasse gelchromatographisch aufgetrennt. Die daraus gewonnenen Peak-Fraktionen wurden in eine SDS-PAGE eingesetzt und die dominierenden Proteinbanden massenspektrometrisch analysiert.

Wie bereits in Kap. III. 2.4.2 beschrieben, resultiert die Auftrennung der *I. hospitalis*-Membranfraktion durch Gelfiltration (GF) in einem Profil mit einer klaren Trennung in fünf prominente Peaks (siehe Abbildung 14A). Eine gelelektrophoretische Auftrennung aufkonzentrierter Proben der Peak-Fraktionen P2 bis P5 mit anschließender Coomassiefärbung sollte die Möglichkeit geben, neben Ihomp1, dem dominierenden Protein der Fraktion P1, weitere Proteinspezies der äußeren Membran für eine massenspektrometrische Analyse im Gel sichtbar zu machen (Kap. II. 6.2).

In Abbildung 30 ist, neben einem Auszug aus Abbildung 14B, welcher die Gelspuren der solubilisierten Membranfraktionen vor der GF und die Peak-Fraktion P1 zeigt (A), auch das Resultat der erneuten elektrophoretischen Auftrennung der Peak-Fraktionen P2 bis P5 dargestellt (B).



**Abbildung 30: Elektrophoretische Auftrennung ausgewählter Fraktionen der GF der *I. hospitalis* Membranfraktion.** (A) Ausschnitt aus der in Abbildung 14B dargestellten SDS-PAGE; Membranfraktion vor der GF(V), Peak P1 der GF; (B) SDS-PAGE (10 % AA), Auftragung: konzentrierte Proben der Peaks P2 bis P5 der GF; rote Umrahmungen und Nummerierungen markieren die, für die Proteinidentifikation ausgewählten Banden.

Während die Fraktion P1 eindeutig durch den bereits beschriebenen Ihomp1-Komplex dominiert wird (blaue Markierung in Abbildung 30A), zeigen die Fraktionen P2 bis P5 über die gesamte Trennstrecke der SDS-PAGE hinweg weitere intensive Banden unter-

schiedlicher Mobilität. Diese wurden in Folge für die MS-Analyse durch Ausschneiden isoliert und in einen tryptischen In-Gel-Verdau eingesetzt (Kap. II. 13.2).

Wie in Abbildung 30B durch rote Markierungen kenntlich gemacht, wurden in Summe vierzehn Proteinbanden ausgewählt und nach Kap. II. 13.2.1 für eine Proteinidentifikation über MALDI MS/MS vorbehandelt. Tabelle 6 nennt die Protein-IDs der identifizierten Proteinspezies entsprechend der in Abbildung 30B getroffenen Bandennummerierung und gibt die Resultate der Recherchen mit dem Vorhersageprogramm Phobius und der NCBI-Proteindatenbank wieder. Eine detaillierte Auflistung der bioinformatischen Daten, der Ergebnisse der Datenbankabgleiche mit weiteren öffentlichen Datenbanken sowie der mutmaßlichen Funktionen aller im Rahmen dieser Arbeit identifizierten Proteine ist im Anhang zu finden (siehe Kap. VI. 2; Tabelle: *Kapitel III. 3.1 Untersuchungen der Reinkultur*). Im Rahmen der Mascot Datenbankrecherche gegen die NCBI-Proteindatenbank konnten anhand des Peptidmassenfingerprints (PMF) und den teilweise gewonnenen Fragmentspektren zwölf der insgesamt vierzehn untersuchten Proteinbanden einzelnen proteinkodierenden Sequenzen (CDS) aus *I. hospitalis* eindeutig zugeordnet werden. Als Kriterium für eine exakte Identifizierung diente dabei ein signifikanter Scorewert von >80. Die Zuordnung der im Rahmen des In-Gel-Verdaus gewonnenen Peptid- und Fragmentmassen der Proteinbanden 4 und 6 ist dementsprechend zurückhaltend zu bewerten und bedarf einer manuellen Überprüfung.

Für die intensive Bande 4 (Igni\_0670) konnte bereits in früheren, unabhängigen Arbeiten ein N-Terminus bestimmt und so die Expression des Proteins nachgewiesen werden (Müller, 2005; Meyer, 2007). Igni\_0670 ist Gegenstand aktueller Forschung und wird als strukturgebendes Protein der Zellanhänge von *I. hospitalis* diskutiert (C. Meyer, persönliche Mitteilung). Die Ursache für den vergleichsweise niedrigen Mascot Score (60) könnte in der für die Primärstruktur des Proteins vorhergesagten Transmembrandomäne liegen. Der massenspektrometrische Nachweis für derartige, partiell gefaltete, integrale Membranproteine ist teilweise erschwert, da im Verlauf der enzymatischen Spaltung im Vorfeld der MS die Anzahl der pro Protein generierten Peptide, welche als Grundlage für eine sichere Identifizierung dienen, aus sterischen Gründen niedriger ist (Klein *et al.*, 2005). Die Signifikanz der Identifikation des Proteins Igni\_0642 (Bande 6) ist mit einem Mascot Score von 72 zwar fragwürdig, für eine zuverlässige Zuordnung steht jedoch neben elf Peptiden auch ein Fragmentspektrum zur Verfügung. Da derartige Spektren deutlich proteinspezifischer sind als PMFs, unterstützt die korrekte Zuordnung dieses Fragmentpektrums die Identifikation des Proteins Igni\_0642 erheblich. Weder die Genomdaten noch ein Sequenzvergleich mit öffentlichen Proteindatenbanken gaben Aufschluss über eine mögliche Funktion des Proteins. Da durch Phobius, TMHMM und SOSUI weder eine Signalsequenz noch eine Transmembrandomäne vorhergesagt werden konnten, bleibt

ungeklärt, ob es sich um ein membranassoziiertes oder membranständiges Protein oder um ein cytoplasmatisch lokalisiertes Protein handelt.

Tabelle 6: Übersicht identifizierter Proteine aus *I. hospitalis* nach Auftrennung der solubilisierten Membranfraktion über GF (Abbildung 30B). [1] Protein-ID; [2] Auftreten eines Signalpeptides und Anzahl der vorhergesagten Transmembran-Helices (TMH) nach Phobius; [3] Annotation und bester Treffer des Datenbankabgleichs mit der NCBI-Proteindatenbank; [4] Signifikanz der Treffer: (1) Mascot Score und Anzahl der zugeordneten Peptide und Fragmente (Score / Nr. Peptide; Nr. Fragmente), (2) e-value / Sequenzidentität in % für den 1°hit; [5] mutmaßliche subzelluläre Lokalisation (C: cytoplasmatisch, CM: cytoplasmamembranassoziiert; M: membranständig, P: periplasmatisch, E: extrazellulär).

Nr	[1]	[2]	[3]	[4]	[5]
1	Igni_1367	/	Nickel-dependent hydrogenase, large subunit 1°hit: Nickel-dependent hydrogenase, large subunit	(1) 328 / 16; 2 (2) 0 / 54	CM
2	Igni_0679	/	Sodium-transporting two-sector ATPase 1°hit: V-type ATP synthase subunit B [Hbut_0783]	(1) 169 / 23; 1 (2) 0 / 75	CM
3	Igni_1007	/	Enolase 1°hit: Phosphoenolpyruvate hydratase [Tpen_0112]	(1) 90 / 10; 2 (2) 7e-151 / 65	C
4	Igni_0670	1 TMH	hypothetical protein Igni_0670 1°hit: hypothetical protein [Hbut_0214]	(1) 60 / 10; 0 (2) 6e-05 / 48	M; E
5	Igni_0459	/	Alkyl hydroperoxide reductase/ Thiol specific antioxidant 1°hit: Peroxiredoxin family [Hbut_0228]	(1) 361 / 24; 3 (2) 1e-94 / 72	C
6	Igni_0642	/	hypothetical protein Igni_0642 1°hit: hypothetical protein [Hbut_0246]	(1) 72 / 11; 1 (2) 4e-07 / 25	C
7	Igni_1383	/	Translation elongation factor 2 (EF-2/EF-G) 1°hit: Elongation factor 2 [Hbut_0840]	(1) 442 / 40; 4 (2) 0 / 70	C
8	Igni_1201	SP	Solute binding protein-like protein 1°hit: Solute binding protein-like protein [Nmar_0618]	(1) 223 / 25; 3 (2) 1e-148 / 36	CM/ P
9	Igni_0899	SP	FAD-dep. pyridine nucleotide-disulphide oxidoreductase 1°hit: hypothetical protein [NEQ024]	(1) 293 / 24; 3 (2) 3e-141 / 67	C
10	Igni_0139	SP	Extracellular ligand-binding receptor 1°hit: Extracellular ligand-binding receptor [Igni_0140]	(1) 245 / 18; 5 (2) 5e-103 / 45	CM; P; E
11	Igni_1150	/	Translation elongation factor 1A (EF-1A/EF-Tu) 1°hit: Elongation factor 1-alpha [Hbut_1581]	(1) 267 / 23; 4 (2) 0 / 81	C
12	Igni_0608	/	Ketol-acid reductoisomerase 1°hit: Ketol-acid reductoisomerase	(1) 269 / 18; 4 (2) 3e-125 / 66	C
13	Igni_0459	/	Alkyl hydroperoxide reductase/ Thiol specific antioxidant 1°hit: Peroxiredoxin family [Hbut_0228]	(1) 262 / 21; 3 (2) 1e-94 / 72	C
14	Igni_1348	/	Desulfoferrodoxin, ferrous iron-binding region 1°hit: Desulfoferrodoxin, ferrous iron-binding region	(1) 173 / 8; 4 (2) 8e-50 / 75	C

Vor dem Hintergrund einer Charakterisierung der Interaktionsstelle zwischen *I. hospitalis* und *N. equitans* wurde die Datenauswertung auf mögliche membranständige und membranassoziierte Proteine fokussiert. Entsprechend einer Klassifikation nach der IMG-Datenbank (*Integrated Microbial Genomes system*; siehe Kap. II. 13.3) umfasst das Genom von *I. hospitalis* 216 Gene, welche für Transmembranproteine kodieren. Im Rahmen der Analyse

der Fraktionen P2 bis P5 der GF der Membranfraktion von *I. hospitalis* konnte mit Igni\_0670 nur ein einziges dieser Proteine als potenziell membranständig nachgewiesen werden. Diese Vorhersage konnte in einem unabhängigen Ansatz durch Immunlokalisationsstudien mit spezifischen Antikörpern für das Protein bestätigt werden (Meyer, 2007; Wasserburger, 2008). Tatsächlich wurde Igni\_0670 sowohl in den Zellanhängen der Zelle als auch in der äußeren und der Cytoplasmamembran nachgewiesen und ist demnach sowohl extrazellulär als auch membranständig lokalisiert. Im Folgenden soll auf die Proteinspezies eingegangen werden, welche aufgrund der Annotation nach der NCBI-Proteindatenbank und anderen öffentlichen Datenbanken als membrannahe bzw. membranassoziiert eingeordnet werden können.

Durch die massenspektrometrische Analyse der Banden 8 und 10 konnten ein *Solute binding protein-like* Protein (Igni\_1201) und ein *Extracellular ligand-binding receptor* (Igni\_0139) identifiziert werden, welche entsprechend dieser Funktionsvorhersage jeweils als Teil eines ABC-Transporters fungieren können und demnach als membranassoziiert oder periplasmatisch bzw. extrazellulär lokalisiert betrachtet werden müssen (Elfering *et al.*, 2001; Hollenstein *et al.*, 2007). Igni\_1201 konnte bereits in früheren Analysen durch N-terminale Sequenzierung einer Proteinbande der Fraktion K1 aus einer chromatographischen Auftrennung der Fraktion der äußeren Membran von *I. hospitalis* über Edman-Abbau identifiziert werden (N'-GPGAKADDEL; Kap. III 2.4.3). Das Gen igni\_1201 kodiert für ein mutmaßliches Oligopeptid-Bindeprotein mit einer Molekularmasse von 87,73 kDa. Im Verlauf der elektrophoretischen Auftrennung zeigt das Protein mit 50 - 70 kDa jedoch eine erhöhte Mobilität. Die Ursache für diesen Effekt ist bislang nicht geklärt. Im Vergleich mit Igni\_1201 ist die Differenz der Werte für die apparente und die auf Grundlage der Primärstruktur bestimmte Molekularmasse des Proteins Igni\_0139 mit ca. 8 kDa (55 kDa - 47,413 kDa) relativ gering, weshalb die in Abbildung 30B markierte Proteinbande Nummer 10 mit hoher Wahrscheinlichkeit als monomere und ungefaltete Form des Proteins anzusehen ist. Entsprechend der Vorhersage des Programms Phobius kodieren die Aminosäuresequenzen der Proteine Igni\_1201 und Igni\_0139 jeweils ein Signalpeptid, was auf eine gerichtete, posttranskriptionale Translokation der Proteine in Richtung der Zellhülle hinweist.

Auch im Falle von Igni\_0899 (Bande 9) konnte mit Hilfe von Phobius ein Signalpeptid vorhergesagt werden. Entsprechend des in Kapitel III. 2.1 beschriebenen Nachweises des Proteins in der cytoplasmatischen Fraktion 1 durch N-terminale Sequenzierung und der Annotation des Proteins als *FAD-dependent pyridine nucleotide-disulphide oxidoreductase* ist von einer cytoplasmatischen Orientierung des Proteins auszugehen. Wie eine Datenbankrecherche über NCBI-BLAST in der NCBI-Proteindatenbank ergab, zeigt Igni\_0899 die höchste Sequenzidentität (67 %) mit einem im Genom von *N. equitans*

annotierten Protein (NEQ024). Nachdem der Sequenzvergleich mit den Genomdaten der im Vergleich mit *N. equitans* näher verwandten Gattung *Pyrobaculum* ebenfalls Übereinstimmungen, jedoch mit niedrigeren Werten, lieferte (50 %), ist als Ursache für die auffällige Sequenzähnlichkeit der Gene *igni\_0899* und *neq024* ein Austausch in Form eines lateralen Gentransfers vorstellbar. Im Rahmen dieser Arbeit konnten weitere Proteine mit vergleichbaren Befunden identifiziert werden. Das Ergebnis eines umfassenden Genomvergleiches von *I. hospitalis* und *N. equitans* in Bezug auf weitere mögliche Kandidaten für einen lateralen Gentransfer ist in Kapitel III. 3.2.5 zu finden.

Die mutmaßliche Funktion des Proteins *Igni\_0899* in *I. hospitalis* ist weniger im Austausch mit *N. equitans* als vielmehr im Zusammenhang mit der anoxischen Lebensweise der Spezies zu finden. Die Proteinfamilie der *FAD-dependent pyridine nucleotide-disulphide oxidoreductase*, welcher *Igni\_0899* zugeschrieben wird, umfasst sowohl Enzyme der ersten und zweiten Klasse der Oxidoreduktasen als auch der NADH-Oxidasen und Peroxidasen. *Igni\_0899* fungiert als Oxidoreduktase vermutlich im Zusammenhang mit der Reaktivierung des ebenfalls in der cytoplasmatischen Fraktion 1 des Saccharosegradienten (Kap. III. 2.1) und in der Fraktion der äußeren Membran nachgewiesenen Peroxiredoxins (*Igni\_0459*).

*Igni\_0459* konnte auf Grundlage signifikanter Mascot Scores durch die massenspektrometrische Analyse der in Abbildung 30B markierten Proteinbanden 5 und 13 eindeutig identifiziert werden. Enzyme der Peroxiredoxin-Familie sind für die Reduktion reaktiver Sauerstoff- und Stickstoffspezies und organischer Hydroperoxide verantwortlich und bewahren demnach die Zelle vor oxidativem Stress ( $\text{ROOH} + 2[\text{H}] \rightarrow \text{ROH} + \text{H}_2\text{O}$ ) (Wood *et al.*, 2003; Limauro *et al.*, 2006; Boucher *et al.*, 2006). Sowohl *Igni\_0899* als auch *Igni\_0459* sind auf Grundlage der Annotation und des bereits beschriebenen Nachweises beider Proteine in einer durch elektronenmikroskopische Analysen als cytoplasmatisch identifizierten Fraktion des Saccharosegradienten als nicht membranassoziiert oder membranständig zu betrachten.

Ebenfalls auf Grundlage einer eindeutigen und einheitlichen Funktionsvorhersage durch NCBI-Blast, PFAM und Phyre konnten die Proteine *Igni\_1367* (Bande 1) und *Igni\_0679* (Bande 2) einer membrannahen Lokalisation, an der Cytoplasmamembran, zugeordnet werden. *Igni\_1367* konnte nach tryptischem In-Gel-Verdau und MALDI MS/MS-Analyse als große Untereinheit der *Nickel-dependent hydrogenase* identifiziert werden. Das Protein ist Teil eines Multiproteinkomplexes der Cytoplasmamembran, welcher in der Energiegewinnung von *I. hospitalis* eine entscheidende Rolle einnimmt (Hedderich *et al.*, 1999; Huber *et al.*, 2000; Paper *et al.*, 2007). Obwohl das Protein eine intensive Bande in der Fraktion der äußeren Membran zeigt, konnte die Recherche mit Phobius, TMHMM und SOSUI keine charakteristischen Transmembrandomänen nachweisen. Nach Betrachtung der Annotation der benachbarten Gene scheint das Gen *igni\_1367* in einer Operonstruktur

gemeinsam mit den drei Genen igni\_1366, igni\_1368 und igni\_1369 organisiert zu sein. Nachdem Igni\_1366 neben einem Tat-Signal für einen gerichteten Transport nativ gefalteter Proteine an die Cytoplasmamembran auch eine C-terminale Transmembrandomäne als Membrananker aufweist und für Igni\_1368 fünf Transmembrandomänen vorhergesagt werden konnten, ist eine Co-Transkription und Co-Translokation von Igni\_1367 vor dem Hintergrund der mutmaßlichen Operonstruktur denkbar.

Igni\_0679, welches mit einer apparenten Mobilität von etwa 53 kDa als monomere Form in der SDS-PAGE vorliegt (MW<sub>berechnet</sub> 52,3 kDa), ist annotiert als *Sodium-transporting two-sector ATPase* und repräsentiert mit hoher Wahrscheinlichkeit die B-Untereinheit der A<sub>1</sub>-A<sub>o</sub> ATP-Synthase aus *I. hospitalis*. Dieser Haupt-Enzymkomplex der Energiegewinnung nutzt Na<sup>+</sup>- oder H<sup>+</sup>-Gradienten für die Generierung von ATP-Molekülen (Boyer, 1997; Lewalter und Müller, 2006). Die Architektur und Funktionsweise dieses Multiproteinkomplexes wird gegenwärtig im Rahmen einer Doktorarbeit am Institut für Mikrobiologie der Universität Regensburg von Ulf Küper eingehend untersucht. Die CDS des Proteins Igni\_0679 kodiert für die typischen Domänen einer A/B-Untereinheit der ATP-Synthase, inklusive einer N-terminalen  $\beta$ -Barrel-Struktur, einer zentralen Region mit einem Walker A und Walker B Motiv und einer charakteristischen C-terminalen Domäne. Die Sequenzähnlichkeit der ersten 50 Treffer einer NCBI-Blast-Recherche, welche als B-Untereinheiten der ATP-Synthase annotiert sind, ist mit 60 % bis 75 % Übereinstimmung sehr hoch. Zudem sind die im Rahmen der Recherche identifizierten Proteine zumeist auf crenarchaeelle Spezies zurückzuführen, einem Phylum der Archaea, dem auch die Gattung *Ignicoccus* angehört (Burggraf *et al.*, 1997). Nachdem durch elektronenmikroskopische Analysen der Kontaktstelle zwischen *I. hospitalis* und *N. equitans* an Ultradünnsschnitten wiederholt eine Annäherung der Cytoplasmamembran an die äußere Membran in diesem Bereich nachgewiesen werden konnte (Junglas *et al.*, 2008), ist eine Funktion der Protein Igni\_1367 und Igni\_0679 im Rahmen eines energieabhängigen Zell-Zell-Austausches denkbar. Da es sich bei beiden Proteinen nicht um Oberflächenproteine handelt, bleibt die Frage nach den strukturgebenden Proteinen der 24-nm-Komplexe jedoch weiterhin ungeklärt.

Neben den bereits beschriebenen, vermutlich cytoplasmatischen Proteinen Igni\_0459, Igni\_0642 und Igni\_0899 wurden im Rahmen der proteinanalytischen Untersuchung der Fraktion der äußeren Membran von *I. hospitalis* vier weitere Proteine mit vergleichbarer Lokalisierung identifiziert. Die Vorhersage der Lokalisation dieser Proteine beruht auf der im Genom annotierten mutmaßlichen Funktion. Im Rahmen einer Primärstrukturanalyse mit den Vorhersageprogrammen Phobius, TMHMM und SOSUI konnten zudem für keine der getesteten Sequenzen charakteristische Membranproteindomänen wie Signalpeptide oder Transmembran-Helices nachgewiesen werden. Bei den Proteinen handelt es sich um eine Enolase (Igni\_1007), die zwei Translationelongationsfaktoren 1A (Igni\_1150) und 2

(Igni\_1383), eine *Ketol-acid reductoisomerase* (Igni\_0608) und ein *Desulfoferrodoxin* (Igni\_1348), welches, ähnlich zu Igni\_0459 und Igni\_0899, vermutlich eine Funktion in der Abwehr der Zelle gegen oxidativen Stress einnimmt.

Im Ergebnis der massenspektrometrischen Analyse der vierzehn dominierenden Proteinspezies der äußeren Membran von *I. hospitalis* ist eine Kontamination der Membranfraktion durch vermutlich cytoplasmatisch lokalisierte Proteinspezies festzustellen (Igni\_0459, Igni\_0608, Igni\_0642, Igni\_0899, Igni\_1007, Igni\_1150, 1348 und Igni\_1383), welche wahrscheinlich auf die Bildung von cytoplasmagefüllten Vesikeln im Verlauf des Zellaufschlusses zurückzuführen ist. Die Sedimentation derartiger Vesikel im Verlauf der Dichtegradienten-Zentrifugation ist vergleichbar mit der der äußeren Membran, was die beschriebene Kontamination erklären würde.

Mit Igni\_0670 konnte nur ein potenziell membranständiges Protein identifiziert werden, welches in seiner Funktion bereits der Generierung der Zellanhänge zugeschrieben wird (Müller, 2005; Meyer, 2007). Vier weitere Proteine sind entsprechend der Funktionsvorhersage mutmaßlich im Bereich der Cytoplasmamembran lokalisiert. Die Untersuchung ergab keine neuen Hinweise auf die für die Bildung der 24-nm-Komplexe in der äußeren Membran verantwortlichen Proteine.

Eine ausführliche Beschreibung aller im Rahmen der Membranpräparation (Kap. III. 1), der nativen Aufreinigung des Ihomp1-Proteins (Kap. III. 2.4.3) und der proteinanalytischen Untersuchung der Fraktion der äußeren Membran identifizierten Proteinspezies (Kap. III. 3.1) ist in einer aktuellen Veröffentlichung beschrieben (Burghardt *et al.*, 2008).

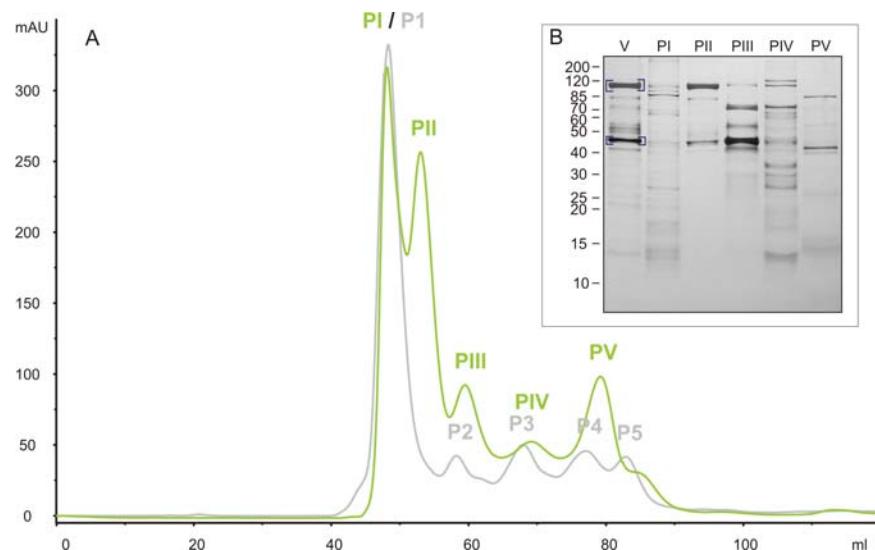
### 3.2 Untersuchungen der Co-Kultur

Wie durch elektronenmikroskopische Analysen der Co-Kultur von *I. hospitalis* und *N. equitans* gezeigt werden konnte, kommt es im Rahmen der gemeinschaftlichen Lebensweise zur Ausbildung verschiedener Formen eines Zell-Zell-Kontaktes zwischen den Organismen, welche dabei vermutlich einen Stoffaustausch betreiben. Dieser kann sowohl auf einen Vesikeltransfer als auch auf einen direkten Membrankontakt beruhen (Junglas *et al.*, 2008; Wasserburger, 2008). Um die an der Ausbildung der Kontaktstelle beteiligten Proteine identifizieren zu können, wurde eine schonende Präparation der Zellhüllen der Co-Kultur analog zu dem Protokoll der Isolation der Zellbestandteile von *I. hospitalis* durchgeführt (Kap. II. 5). Im Rahmen der Untersuchungen wurde nach der Züchtung der Co-Kultur und einer differentiellen Zentrifugation ein Zellpellet aus Ignicoccen und daran anhaftenden Nanoarchaeen gewonnen. Dieses Zellpellet wurde wie in Kapitel II. 5 beschrieben in hypotonem Puffer resuspendiert und in einen Zellaufschluss eingesetzt. In Folge der anschließenden Auftrennung des Zellhomogenates durch Dichtegradienten-Zentrifugation

konnte analog zu Kapitel III. 1 eine rotbraun gefärbte, membranhaltige Fraktion aus dem unteren Bereich des Saccharosegradienten isoliert werden, welche neben der äußeren Membran von *I. hospitalis* auch Fragmente des S-Layers von *N. equitans* enthielt und im Folgenden als Zellhüllfraktion bezeichnet wird. Diese Fraktion sollte anschließend, vergleichbar zu der Fraktion der äußeren Membran von *I. hospitalis*, bezüglich ihrer Protein-zusammensetzung analysiert werden und wurde dazu analog zur Reinkultur solubilisiert (Kap. II. 7) und in eine gelchromatographische Auftrennung eingesetzt (Kap. II. 6.2). Eine quantitative massenspektrometrische Analyse der aus der Gelfiltration (GF) gewonnenen Peak-Fraktionen sollte ein möglichst vollständiges Bild der Protein-zusammensetzung der Zellhüllfraktion liefern.

### 3.2.1 Gelchromatographische Auftrennung der Zellhüllfraktion

Das Profil dieser nativen Auftrennung der Zellhüllfraktion zeigte neben deutlichen Übereinstimmungen auch klare Unterschiede zu dem GF-Profil der Fraktion der äußeren Membran von *I. hospitalis* (Abbildung 31A).



**Abbildung 31: Vergleichende Darstellung der chromatographischen Auftrennung der Fraktion der äußeren Membran von *Ignicoccus hospitalis* aus Rein- und Co-Kultur über Gelfiltration.** (A) Elutionsprofile der GF der Reinkulturprobe (grau, aus Abbildung 14) und der Co-Kulturprobe (grün); Elutionsvolumen der Peaks PI bis PV5:  $V_{PI}= 48 \text{ ml}$ ;  $V_{PII}= 53 \text{ ml}$ ;  $V_{PIII}= 59 \text{ ml}$ ;  $V_{PIV}= 69 \text{ ml}$ ;  $V_{PV}= 79 \text{ ml}$ , (B) SDS-PAGE (10 % AA), Auftragung: Co-Kulturprobe vor der GF (V), dominierenden Peaks der GF der Co-Kulturprobe (PI bis PV); blaue Markierung siehe Text.

Wie im Falle der Reinkultur ist das GF-Profil der Co-Kultur-Probe durch eine Trennung der Fraktion in fünf prominente Peaks geprägt. Es wird deutlich, dass im Rahmen der Zellzucht und der Präparation der Zellhüllfraktion aus der Co-Kultur eine Veränderung in der Protein-zusammensetzung im Vergleich zu der analog präparierten Reinkultur stattgefunden hat.

Während sich im Vergleich zum GF-Profil der Reinkultur im vorderen Elutionsbereich ein zusätzlicher, intensiver Peak ausbildet (PII), zeigt das Profil im Elutionsbereich von 75 ml bis 85 ml anstelle zweier gleichstarker Peaks (P4 und P5) nur einen prominenten, etwa doppelt so hohen Peak (PV). Trotz dieser Unterschiede weisen die Profile auffällige Übereinstimmungen sowohl in Bezug auf die Intensität der prominenten Peaks als auch bezüglich deren Elutionsvolumina auf (Tabelle 7).

Tabelle 7: Elutionsvolumina der dominierenden Peaks der Rein und Co-Kultur nach Gelfiltration der solubilisierten Fraktion der äußeren Membran bzw. der Zellhülle.

	PI / P1	PII	PIII / P2	PIV / P3	P4	PV	P5
Reinkultur	48 ml		58 ml	68 ml	77 ml		83 ml
Co-Kultur	48 ml	53 ml	59 ml	69 ml		79 ml	

Um einen Eindruck über die Protein Zusammensetzung der Peak-Fraktionen PI bis PV zu gewinnen, wurden die entsprechenden GF-Fraktionen zusammen mit einer Probe der solubilisierten Zellhüllfraktion in eine gelelektrophoretische Auftrennung mit anschließender Silberfärbung eingesetzt (Abbildung 31B).

Die Zellhüllfraktion (Spur "V") zeigt in der SDS-PAGE ein übersichtliches Bandenspektrum, welches sich über einen Molekularmassenbereich von 10 bis 120 kDa erstreckt. Sie ist geprägt durch zwei intensive Proteinbanden mit Molekularmassen von 45 und 100 kDa (Abbildung 31B; blaue Markierung). Eine massenspektrometrische Analyse dieser beiden Banden ergab, dass es sich dabei um die dominierenden Oberflächenproteine der beiden Spezies handelt. Zum einen konnte das S-Layer-Protein NEQ300 aus *N. equitans* (100-kDa-Bande; Schuster, 2003), zum anderen das bereits beschriebene, dominierende Membranprotein, Ihomp1, aus der äußeren Membran von *I. hospitalis* nachgewiesen werden (45-kDa-Bande). Im Vergleich zu der Zellhüllfraktion (Spur "V") sind die Peak-Fraktionen der GF in der SDS-PAGE durch ein komplexeres Bandenmuster gekennzeichnet (Abbildung 31B). Während die Fraktionen PI und PIV durch das Auftreten vieler, niedrig konzentrierter Proteinbanden charakterisiert sind, welche sich über die gesamte Trennstrecke hinweg verteilen, sind die Fraktionen PII und PIII durch die Proteine Ihomp1 und NEQ300 dominiert. Die Peak-Fraktion PV zeigt ein vergleichsweise einfaches Bandenspektrum und ist durch zwei schwache Proteinbanden mit einer Mobilität von ca. 40 bzw. 85 kDa gekennzeichnet.

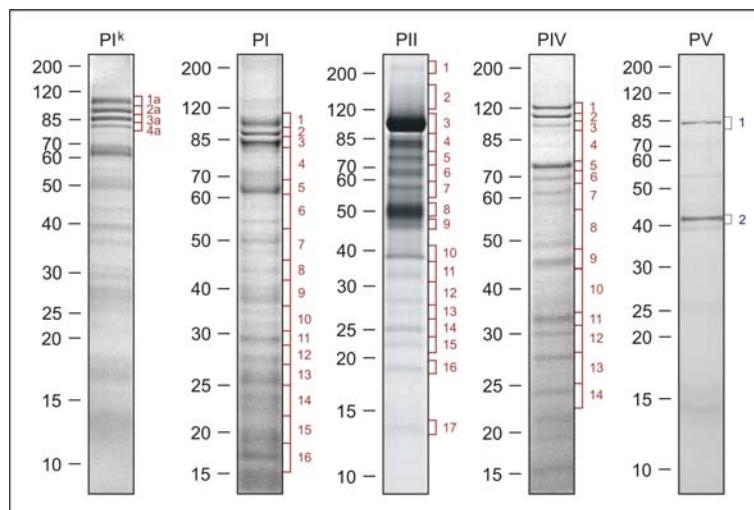
### 3.2.2 Massenspektrometrische Analyse der gewonnenen Peak-Fraktionen

Immunlokalisationsstudien an Ultradünnsschnitten der Kontaktstelle zwischen *I. hospitalis* und *N. equitans* deuten stark auf eine Beteiligung der beiden Oberflächenproteine Ihomp1 und NEQ300 an dem Aufbau des Interaktionskontaktes zwischen den beiden Zellen hin (Gürster, 2007; Junglas *et al.*, 2008; Wasserburger, 2008; Meyer, unveröffentlicht). Daher können beide Proteine als Leitproteine bzw. Indikatoren für diese Struktur betrachtet werden. Diesem

Befund folgend, deutet die Co-Lokalisation der beiden Proteinspezies in den Peak-Faktionen PII und PIII auf einen Erhalt der Interaktionskomplexe im Verlauf der Präparation hin, was die Vermutung zulässt, dass diese Fraktionen, Proteine enthalten, die am Aufbau des Komplexes beteiligt sind. Da das Bandenmuster der Peak-Faktion PIII im Vergleich zu der Fraktion PII in der SDS-PAGE komplexer erscheint, ist es denkbar, dass die Fraktion PIII neben den Proteinen des Interaktionskomplexes weitere Proteine oder Proteinkomplexe enthält. Demzufolge fokussierte sich die Analyse des mutmaßlichen Interaktionskomplexes auf die Peak-Faktion PII.

Im Rahmen der in Kap. III. 3.1 beschriebenen massenspektrometrischen Analyse der dominierenden Proteinbanden der Peak-Faktionen einer gelchromatographischen Auftrennung der äußeren Membran von *I. hospitalis* konnte mit Igni\_0670 nur ein potenziell membranständiges Protein identifiziert werden konnte. Daher wurde eine quantitative Analyse der in diesem Ansatz gewonnenen Peak-Faktionen durchgeführt. Auf diese Weise sollten zum einen die Protein Zusammensetzung des Interaktionskomplexes untersucht und zum anderen weitere, möglicherweise am Austausch zwischen den Organismen beteiligte Membranproteine identifiziert werden.

Die Peak-Faktionen wurden dazu analog zu Kap. III. 3.1 erneut geelektrophoretisch aufgetrennt, ausgewählte Bereiche der Gelspuren durch Ausschneiden isoliert und anschließend für die massenspektrometrische Analyse in einen tryptischen In-Gel-Verdau eingesetzt (Abbildung 32).



**Abbildung 32: Elektrophoretische Auftrennung der dominierenden Peaks der in Abbildung 31 dargestellten Gelfiltration einer Membranfraktion der Co-Kultur. SDS-PAGE (10 % AA) Auftragung: Peak I bis V der GF (PI bis PV), PI<sup>k</sup>: Auf trennung der Fraktion P1 auf einem kommerziellen SDS-Gel; Umrahmungen und Nummerierungen markieren für die Proteinidentifikation ausgewählte Proteinbanden rot ESI Nano-LC MS/MS blau MALDI MS/MS.**

Um eine möglichst vollständige Identifikation sämtlicher Proteinbanden des Trennbereiches der SDS-PAGE zu gewährleisten, wurden im Falle der komplexen Fraktionen PI, PII, und

PIV sowohl einzelne Proteinbanden als auch ganze Gelbereiche isoliert und in eine quantitative ESI Nano-LC MS/MS-Analyse eingesetzt (Abbildung 32; rote Markierungen). Im Unterschied dazu beschränkte sich die Untersuchung der Fraktion PV, welche sich bezüglich des Bandenmusters vergleichsweise einfach darstellte, auf eine gezielte Analyse der beiden 85- und 40-kDa-Proteinbanden im Rahmen eines MALDI MS/MS-Ansatzes (Abbildung 32, blaue Markierungen). Da die Fraktion PIII als Schnittmenge der Fraktionen PII und PIV anzusehen ist, wurde diese Fraktion aufgrund des hohen zeitlichen und technischen Aufwandes der Analyse zurückgestellt.

Im Rahmen der Probenvorbereitung für die hochsensitive ESI Nano-LC MS/MS-Analyse wurden für die elektrophoretische Auftrennung der Peak-Fraktionen neben selbst hergestellten Gelen auch kommerzielle Gele eingesetzt. Diese gewährleisten neben einer geprüft niedrigen Kontamination mit Fremdproteinen auch eine explizit hohe Auflösung im Verlauf der elektrophoretischen Auftrennung der Fraktionen. Da die Kontamination der selbst hergestellten Gele jedoch vernachlässigbar gering und die Auftrennung der Proteine in der Regel zufrieden stellend war, kamen für die Analyse hauptsächlich nichtkommerzielle, selbst gefertigte Gele zum Einsatz. Lediglich im Falle der Fraktion PI konnte durch die Verwendung eines kommerziellen Gels eine signifikant höhere Auflösung im hochmolekularen Trennbereich erzielt werden, weshalb die MS-Messungen um vier Proteinbanden aus einer solchen Auftrennung erweitert wurde (Abbildung 32; Spur PI<sup>k</sup>).

Im Anschluss an die massenspektrometrische Analyse der in Abbildung 32 markierten Gelbereiche (53 Gelbanden) konnten durch eine Mascot Datenbankrecherche auf Grundlage der gewonnenen Peptidmassen und Fragmentspektren 180 *I. hospitalis*-Proteine und 95 *N. equitans*-Proteine identifiziert werden. Diese hohe Anzahl an identifizierten Proteinen ist auf das gekoppelte Verfahren der ESI Nano-LC MS/MS-Methode zurückzuführen, welche einer Vorauf trennung der Peptide des In-Gel-Vedaus über eine Flüssigkeitschromatographiesäule (Nano-LC) mit einer anschließenden Tandem-Massenspektrometrie (MS/MS) der daraus hervorgehenden Peptid-Fraktionen kombiniert. Auf diese Weise wird die Sensitivität der Analyse erheblich erhöht, wodurch deutlich mehrere Proteinspezies pro Gelbande erfasst werden können. Die Signifikanz der Daten ist dabei analog zu Kapitel III. 3.1 durch einen Scorewert angegeben, welcher sich aus der Wahrscheinlichkeit von Zufallstreffern berechnet. Je nach verwendeter MS-Methode beträgt der Grenzwert für einen signifikanten Protein-Score in diesem Ansatz >50 (ESI NANO-LC MS/MS) bzw. >80 (MALDI MS/MS). Ein Auszug der identifizierten Proteinspezies aus den in Abbildung 32 markierten Gelbereichen ist in Tabelle 11 im Anhang (Kap. VI. 3) wiedergegeben. Eine detaillierte Auflistung der bioinformatischen Daten, der Ergebnisse der Datenbankabgleiche mit den öffentlichen Datenbanken sowie der mutmaßlichen Funktionen ist in tabellarischer Form auf einem

Datenträger im Anhang zu finden (siehe Kap. VI. 2; Tabelle: *Kapitel III. 3.2 Untersuchungen der Co-Kultur*).

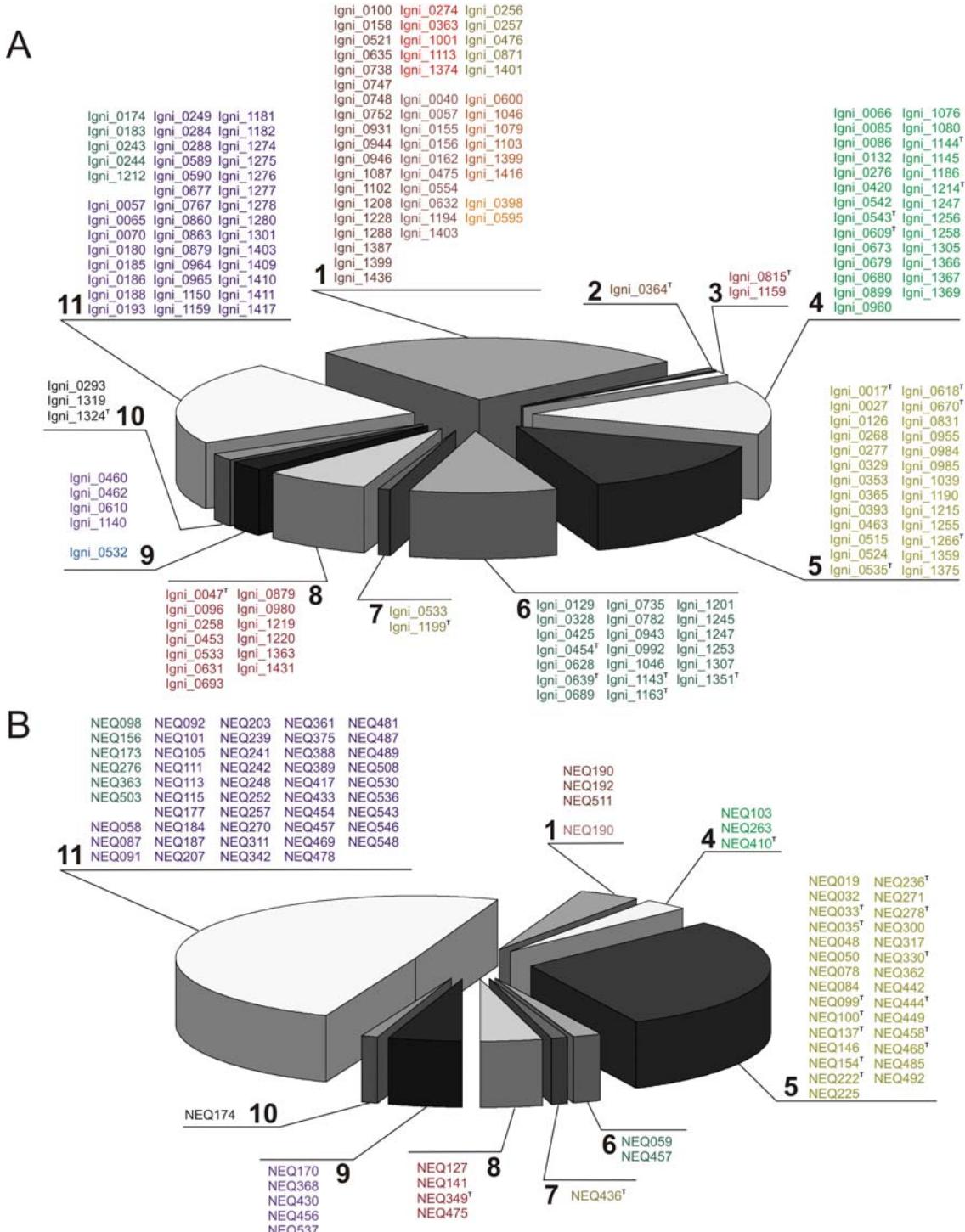
### 3.2.3 Klassifizierung der identifizierten Proteinspezies in COG-Kategorien

Die 275 identifizierten Proteinspezies der Zellhüllfraktion der Co-Kultur aus *I. hospitalis* und *N. equitans* wurden entsprechend ihrer physiologischen Funktion in funktionelle Gruppen eingeteilt. Die Zuteilung erfolgte nach den Klassifizierungsrichtlinien der COG-Datenbank (*Cluster of orthologal genes*) des IMG (*Integrated Microbial Genomes system*). In Tabelle 8 sind 18 der 22 Kategorien dieser Datenbank in einer komprimierten Form, getrennt nach Organismus, aufgelistet. Die Kategorien *Cell motility*, *Defense mechanism*, *Chromatin structure and dynamics* und *Inorganic iron transport and metabolism* sind nicht aufgeführt, da im Rahmen der Analyse der Zellhüllfraktion weder für *I. hospitalis* noch für *N. equitans* Proteine dieser Funktionalität identifiziert werden konnten. Des Weiteren wurden die Bereiche Transport und Metabolismus sowie DNA/RNA und Translation/Transkription zusammenfassend dargestellt. Tabelle 8 führt die daraus hervorgehenden elf Hauptkategorien auf. Für jede Kategorie sind die Anzahl der identifizierten Proteine sowie der prozentuale Anteil dieser Proteine an der Gesamtzahl von 180 (*I. hospitalis*) bzw. 95 (*N. equitans*) identifizierten Proteinen angegeben.

Tabelle 8: Einteilung der identifizierten Proteine der Zellhüllfraktion aus der Co-Kultur in elf Hauptkategorien und insgesamt 18 Kategorien nach der COG-Datenbank des IMG. Die den Kategorien zugeordneten Protein-IDs sind in Abbildung 33 dargestellt.

Kategorie		<i>I. hospitalis</i>	<i>N. equitans</i>
1.1	Transport und Metabolismus von:	Aminosäuren 19 (10,6 %)	3 (3,2 %)
1.2		Kohlenhydrate 5 (2,8 %)	/ /
1.3		Coenzymen 10 (5,6 %)	1 (1,0 %)
1.4		Lipiden 5 (2,8 %)	/ /
1.5		Nukleotiden 6 (3,3 %)	/ /
1.6		Sekundärmetaboliten 2 (1,1 %)	/ /
2	Zellzykluskontrolle, Zellteilung, Chromosomenteilung	1 (0,6 %)	/ /
3	Zellwand, Zellmembran, Zellhüllen Biosynthese	2 (1,1 %)	/ /
4	Energiehaushalt	27 (15,0 %)	3 (3,2 %)
5	hypothetische Proteine, Proteine mit unbekannter Funktion	26 (14,4 %)	29 (30,5 %)
6	generelle Funktion, nicht konkret analysiert	20 (11,1 %)	2 (2,1 %)
7	intrazellulärer Austausch, Sekretion, Vesikeltransport	2 (1,1 %)	1 (1,0 %)
8	Posttranskriptionale Modifikation, Proteinprozessierung, Chaperone	13 (7,2 %)	4 (4,2 %)
9.1	Replikation, Rekombination und DNA Reparatur	4 (2,2 %)	5 (5,3 %)
9.2	RNA Prozessierung, Modifikation	1 (0,6 %)	/ /
10	Signaltransduktion	3 (1,7 %)	1 (1,0 %)
11.1	Transkription	5 (2,8 %)	6 (6,3 %)
11.2	Translation, ribosomale Struktur und Biosynthese	36 (20,0 %)	42 (44,2 %)

Eine graphische Darstellung dieser Daten (Abbildung 33) zeigt die Einteilung der identifizierten Proteintypen gemäß der elf Hauptkategorien getrennt nach *I. hospitalis* und *N. equitans* (Tabelle 8), nennt die den Kategorien zugeordneten Proteinspezies und hebt die nach der IMG-Datenbank vorgeschlagenen integralen Membranproteine durch <sup>T</sup> hervor.



**Abbildung 33: Einteilung der aus der Zellhüllfraktion der Co-Kultur identifizierten Proteine in elf Hauptkategorien nach COG-Klassifikation. (A) *Ignicoccus hospitalis*; (B) *Nanoarchaeum equitans*.** Die Nummerierung der elf Hauptkategorien entspricht Tabelle 8; Mutmaßliche Transmembranproteine sind durch <sup>T</sup> gekennzeichnet. Die Untergliederung in die 18 Kategorien ist durch farbliche Variationen in den Hauptkategorien kenntlich gemacht.

Mit Hilfe einer Recherche in den öffentlichen Datenbanken NCBI und PFAM sowie anhand des Strukturalignment-Programms Phyre konnte für 80 % der 275 identifizierten Proteinspezies eine bekannte, nicht hypothetische Funktion ermittelt werden. Der wesentliche Anteil dieser Proteine ist auf Grundlage der Annotation als cytoplasmatisch lokalisiert einzustufen, was analog zu der in Kapitel III. 3.1 untersuchten Fraktion der äußeren Membran der Reinkultur auf eine starke Kontamination der Zellhüllfraktion mit cytoplasmatischen Proteinen hinweist.

Wie Tabelle 8 und Abbildung 33 deutlich machen, ist der für beide Organismen größte Anteil der identifizierten Proteinspezies der Kategorie 11.2, *Translation, ribosomale Struktur und Biosynthese*, zuzuschreiben (20 %, *I. hospitalis* bzw. 44,2 % *N. equitans*).

Etwa ein Viertel der identifizierten *Ignicoccus*-Proteine (26,2 %) repräsentiert diverse Transport- und Metabolismusfunktionen. Im Falle von *N. equitans* steht dem mit 4,2 % ein wesentlich geringerer Anteil gegenüber. Dieser deutliche Kontrast zwischen den Organismen bezüglich der Verteilung der identifizierten Proteinspezies auf die einzelnen Kategorien korreliert mit den bereits beschriebenen Defiziten bezüglich der Biosynthese und des Metabolismus verschiedener Stoffgruppen im Genom von *N. equitans* (Waters *et al.*, 2003) und spiegelt sich ebenfalls in den Kategorien *Energiehaushalt, generelle Funktionen* und *posttranskriptionale Modifikation* wieder. Die Kategorie 6, *generelle Funktionen, nicht konkret analysiert*, beschreibt Proteine, welche als weit verbreitet und vielfach nachgewiesen gelten, deren Funktion im Zellhaushalt bislang jedoch nicht geklärt ist.

Ein weiterer maßgeblicher Anteil der identifizierten Proteine beider Organismen ist entsprechend der COG-Klassifizierung der Kategorie 5, *hypothetische Proteine, Proteinen mit unbekannter Funktion*, zuzuordnen (siehe Tabelle 8). Während die Vorhersage einer mutmaßlichen Funktion für diese Proteine anhand der Annotation nicht möglich war, konnten für einen wesentlichen Teil dieser funktionell nicht charakterisierten Proteine mit Hilfe der Sekundärstrukturvorhersageprogramme Phobius, TMHMM und SOSUI Signalpeptide und/oder Transmembrandomänen identifiziert werden (40 % *I. hospitalis*, 76 % *N. equitans*), welche auf eine membranennahe Lokalisation der Proteine in der Zelle hinweisen.

### 3.2.4 Identifizierung mutmaßlicher Membranproteine

Wie bereits in Kapitel III. 3.1 erwähnt, sind vor dem Hintergrund der Fragestellung nach den an der gemeinschaftlichen Lebensweise zwischen *I. hospitalis* und *N. equitans* beteiligten Proteinspezies membranassoziierte und membranständige Proteine von besonderem Interesse, um die Vorgänge im Bereich der Kontaktstelle während der Kontaktaufnahme und des anschließenden Austausches zwischen den Organismen zu untersuchen.

Als Hilfsmittel für die Identifizierung derartiger Proteinspezies diente die bereits erwähnte IMG-Datenbank (Kap. II. 13.3; Kap. III. 3.1.1). Die Angaben der Datenbank bezüglich

integraler Membranproteine stützen sich dabei auf die Erkennung von Transmembrandomänen in den proteinkodierenden Sequenzen (CDS) des jeweiligen Genoms. Entsprechend der IMG-Datenbank kodiert das Genom von *I. hospitalis* 216 Proteine, welche in die Klasse der mutmaßlich integralen Membranproteine eingestuft werden können. Hinsichtlich *N. equitans* beläuft sich diese Zahl auf 120 CDS. Im Rahmen der massenspektrometrischen Analyse der Zellhüllfraktion konnten 19 *Ignicoccus*-Proteine und 16 *N. equitans*-Proteine dieser Klasse identifiziert werden (siehe Markierung in Abbildung 33). Somit konnten von diesen 336 mutmaßlich integralen Membranproteinen beider Spezies lediglich 35 massenspektrometrisch nachgewiesen werden. Die Ursache für diese niedrige Nachweisquote von 10 % ist im Wesentlichen in der Abreicherung der Cytoplasmamembran im Verlauf der Präparation der Zellhüllfraktion zu finden. Ein Grossteil der mutmaßlich cytoplasmamembranständigen Transmembranproteine wurde im Verlauf der Dichtegradienten-Zentrifugation wahrscheinlich abgetrennt, weshalb diese Proteine in der Zellhüllfraktion massenspektrometrisch nicht nachweisbar waren.

Fünf der 19 nachgewiesenen, mutmaßlich integralen *Ignicoccus*-Membranproteine und 13 der 16 nachgewiesenen *N. equitans*-Proteine dieser Klasse sind der COG-Kategorie 5, *hypothetische Proteine, Proteinen mit unbekannter Funktion*, zuzuordnen. Fünf weitere *Ignicoccus*-Proteine entfallen nach Einstufung der COG-Datenbank auf die Kategorie 6, *generelle Funktion, nicht konkret analysiert*. Somit sind für 53 % der massenspektrometrisch nachgewiesenen, mutmaßlich integralen *Ignicoccus*-Membranproteine und für 81 % der massenspektrometrisch nachgewiesenen, mutmaßlich integralen *N. equitans*-Membranproteine der Zellhüllfraktion keine konkreten Aussagen bezüglich einer möglichen physiologischen Funktion zu treffen, was eine Auswertung der Daten vor dem Hintergrund der beschriebenen Fragestellung erheblich erschwert.

Neben diesen hypothetischen und funktionell nicht näher beschriebenen Proteinspezies konnten im Rahmen der Analyse der Zellhüllfraktion der Co-Kultur eine Reihe von bereits physiologisch charakterisierten Proteinen identifiziert werden, welchen auf Grundlage der Annotation nach NCBI eine mögliche Funktion im Rahmen der zu untersuchenden Interaktion zwischen *I. hospitalis* und *N. equitans* zukommen könnte. Tabelle 9 listet eine Auswahl dieser Proteine getrennt nach Spezies und entsprechend ihrer physiologischen Funktion auf. Auf diese 30 Proteinspezies, unter denen sich auch Vertreter der nach IMG vorgeschlagenen, mutmaßlich integralen Membranproteine befinden, soll im Folgenden näher eingegangen werden.

Tabelle 9: Auswahl massenspektrometrisch nachgewiesener, mutmaßlich membranständiger oder membranassozierter Proteine aus *I. hospitalis* und *N. equitans*. [1] Protein-ID; mutmaßlich integrale Membranproteine sind durch ein <sup>T</sup> gekennzeichnet; [2] mutmaßliche physiologische Funktion nach NCBI; [3] Einteilung der Proteine in die elf Hauptkategorien der COG-Datenbank entsprechend der physiologischen Funktion (siehe Tabelle 8). [4] Auftreten eines Signalpeptides und [5] Anzahl der vorhergesagten Transmembran-Helices (TMH) nach Phobius; [6] Entsprechende Peak-Fraktion der GF, in der die jeweiligen Proteine nachgewiesen wurden.

[1]	[2]	[3]	[4]	[5]	[6]
Igni_1266 <sup>T</sup>	dominating outer membrane protein [lhomp1]	5	/	1	PI; PII; PIV
Igni_1305	ATP synthase subunit A	4	/	/	PI; PII
Igni_0679	ATP synthase subunit B	4	/	/	PI; PII
Igni_1214 <sup>T</sup>	ATP synthase subunit C	4	/	1	PI; PII
Igni_0680	ATP synthase subunit D	4	/	/	PII
Igni_1080	ATP synthase subunit E	4	/	/	PI; PII
Igni_0609 <sup>T</sup>	ATP synthase subunit I	4	/	8	PI; PII
Igni_0047 <sup>T</sup>	predicted ABC transporter	8	SP	7	PIV
Igni_1219	predicted ABC transporter SufC	8	/	/	PIV
Igni_1220	predicted ABC transporter SufBD	8	/	/	PIV
Igni_0693	AAA family ATPase, CDC48 subfamily	8	/	/	PIV
Igni_1431	AAA family ATPase, CDC48 subfamily	8	/	/	PI; PII
Igni_1201	Solute binding protein-like protein	6	SP	/	PI; PII; PIV
Igni_1199 <sup>T</sup>	Preprotein translocase subunit SecY	7	/	10	PI
Igni_1351 <sup>T</sup>	Exporter of the RND superfamily-like protein	6	SP	11	PII
Igni_0454 <sup>T</sup>	Na <sup>+</sup> /solute symporter	6	/	13	PIV
Igni_1143 <sup>T</sup>	Serine protease-like protein	6	/	4	PI
Igni_1144 <sup>T</sup>	NADH dehydrogenase	4	/	8	PI
Igni_1324 <sup>T</sup>	Carbon starvation protein CstA	10	/	15	PIV
Igni_0618	hypothetical protein (mit Fla-Motiv)	5	SP	1	PII
Igni_0670	hypothetical protein (mit Fla-Motiv); (Meyer, 2007)	5	/	1	PIV
Igni_1366	Nickel-dependent hydrogenase small subunit (mit Tat-Motiv)	4	SP	1	PI
NEQ300	S-layer protein	5	SP	/	PI; PII; PIV
NEQ236 <sup>T</sup>	S-Layer associated protein	5	SP	1	PI; PII; PIV
NEQ103	ATP synthase subunit A	4	/	/	PI; PII
NEQ263	ATP synthase subunit B	4	/	/	PI
NEQ410 <sup>T</sup>	ATP synthase subunit I	4	/	6	PI
NEQ475	AAA family ATPase, CDC48 subfamily	8	/	/	PI
NEQ436 <sup>T</sup>	Preprotein translocase subunit SecD	7	/	6	PI; PII
NEQ137	hypothetical protein (mit Fla-Motiv)	5	/	1	PIV

Durch die quantitative massenspektrometrische Analyse der Peak-Fraktionen PI, PII und PIV mit Hilfe der sensitiven ESI Nano-LC MS/MS-Methode konnten, wie beschrieben, 275 Proteinspezies identifiziert werden. Die dominierenden Oberflächenproteine der beiden Organismen der Co-Kultur, lhomp1 (Igni\_1266) und NEQ300, welche auch als Leitproteine des Interaktionskomplexes zwischen *I. hospitalis* und *N. equitans* gelten (siehe Kap. III. 3.2.2), sind dabei in allen drei untersuchten Peak-Fraktion nachzuweisen (Tabelle 9). Neben dem S-Layer-Protein NEQ300 aus *N. equitans* (33 x identifiziert) ist NEQ236 das am

weitesten verbreitete Protein der Zellhüllfraktion in der SDS-PAGE. Es wird als S-Layer assoziiertes Protein vermutet (Schuster, 2003) und war in 25 der 53 untersuchten Gelbereiche der Peak-Fraktionen PI, PII und PIV zu detektieren. Ihomp1, das dominierende Protein der äußeren Membran von *I. hospitalis*, konnte trotz seiner nachweislich hohen Konzentration in der Zellhüllfraktion (SDS-PAGE Abbildung 31B und Abbildung 32) lediglich in 6 von 53 Gelbereichen massenspektrometrisch identifiziert werden. Als Ursache für diese vergleichsweise niedrige Nachweisrate in den Fraktionen PI, PII und PIV ist die partielle Unverdaulichkeit der Ihomp1-Oligomerformen durch die im Rahmen des In-Gel-Verdaus eingesetzte spezifische Peptidase Trypsin zu nennen. Verdaueexperimente mit nativen Proben des Proteins lassen eine sterische Unzugänglichkeit der spezifischen Trypsin-Spaltstellen (Carboxylende der basischen Aminosäuren Arginin und Lysin) infolge der Homooligomerisierung des Proteins vermuten (nicht gezeigt).

Neben diesen strukturgebenden Proteinspezies der Zellhüllen von *I. hospitalis* und *N. equitans*, konnten in den Fraktionen PI und PII sechs bzw. drei lösliche und membranständige Untereinheiten der ATP Synthasen aus *I. hospitalis* und *N. equitans* identifiziert werden (Tabelle 9). Wie bereits in Kap. III. 3.1.1 erwähnt, handelt es sich bei diesem cytoplasmamembranständigen Enzymkomplex um den Haupt-Enzymkomplex der Energiegewinnung, welcher H<sup>+</sup>- oder Na<sup>+</sup>-Gradienten für die Generierung von ATP-Molekülen nutzt (Boyer, 1997; Lewalter und Müller, 2006). Dieser energieliefernde Prozess könnte für den Metabolitenaustausch zwischen den beiden Organismen eine entscheidende Rolle spielen. Möglicherweise ist dies einer der Gründe für die beschriebene lokale Annäherung der Cytoplasmamembran an die äußere Membran im Bereich der Interaktionsstelle zwischen *I. hospitalis* und *N. equitans* (Junglas *et al.*, 2008; Wasserburger, 2008).

Des Weiteren konnten 17 der 275 massenspektrometrisch nachgewiesenen Proteinspezies der Zellhüllfraktion der COG-Kategorie 8, *Posttranskriptionale Modifikation, Proteinprozessierung, Chaperone*, zugeordnet werden (Tabelle 8). Entsprechend der Annotation der NCBI-Proteindatenbank befinden sich unter diesen 17 Proteinen drei Vertreter der CDC48 Enzymfamilie sowie drei mutmaßliche ABC-Transporter (siehe Tabelle 9). Die übrigen 11 Proteine sind entsprechend ihrer mutmaßlichen physiologischen Funktion als cytoplasmatisch lokalisiert zu betrachten. Dieses sind beispielsweise drei Thermosomenuntereinheiten (Igni\_0096, Igni\_0897 und NEQ141), ein *Heat shock* Protein, Hsp20 (Igni\_1363); das Peroxiredoxin aus *I. hospitalis* (Igni\_0459) und zwei Untereinheiten des Proteasomkomplexes, ebenfalls aus *I. hospitalis*.

Bei den Proteinen der CDC48-Enzymfamilie handelt es sich um AAA-ATPasen (ATPass Associated with diverse cellular Activities), kooperativ wirkende ATPasen, die oligomere Strukturen ausbilden (Hanson *et al.*, 1997). Das eukaryotische Hexamer CDC48/p97, welches durch zwei Kopien einer AAA-Domäne und eine N-terminale Proteinbindungs-

domäne gekennzeichnet ist, (Walker *et al.*, 1982; Bruderer *et al.*, 2004; Dreveny *et al.*, 2004) ist in viele zelluläre Prozesse eingebunden. So ist es unter anderem in Zellteilungs- und Membranfusionsvorgänge involviert (Latterich *et al.* 1995; Rabouille *et al.*, 1995; Rockel *et al.*, 1999) und übernimmt Aufgaben in der Proteinfaltung und -entfaltung bzw. dem proteasomalen Proteinabbau (Richly *et al.*, 2005). Homologe des CDC48/p97-Proteins sind auch in der Domäne der Archaea vertreten (Lupas und Martin, 2002; Halawani und Latterich 2006). Entgegen der weiten Verbreitung dieser Enzymfamilie und dem mutmaßlich hohen Expressionslevel seiner Vertreter (Karlin *et al.*, 2005), konnte dieser homohexamere Komplex bislang jedoch nur in wenigen Archaeen nachgewiesen werden. Zudem ist eine einfache Übertragung der teilweise eukaryotenspezifischen Funktionen nicht möglich, sodass die Funktionalität dieser Proteine in der Domäne der Archaeen noch nicht vollständig aufgedeckt ist (Walter *et al.*, 2006). Das archaeelle VAT-Protein aus *Thermoplasma acidophilum* stellt eines der wenigen, funktionell beschriebenen Beispiele eines solchen CDC48/p97-homologen Proteins dar. Für dieses Protein wurde bereits eine Beteiligung im Verlauf der energieabhängigen Proteinfaltung und -degradation nachgewiesen (Golbik *et al.*, 1999; Coles *et al.*, 1999; Gerega *et al.*, 2005). Im Falle von *Sulfolobus solfataricus* wurde es im Zusammenhang mit einem exosomenartigen Komplex beschrieben (Evguenieva-Hackenberg *et al.*, 2003; Walter *et al.*, 2006).

Die zwei in Tabelle 9 aufgeführten ABC-Transporter-Untereinheiten, Igni\_1219 (SufC) und Igni\_1220 (SufBD) sind in die Biosynthese von Eisen-Schwefel-Clustern involviert, welche als Kofaktoren an Enzymreaktionen beteiligt sind und dabei in den Elektronentransfer eingebunden sind. Die ATPase-Untereinheiten typischer ABC-Transporter katalysieren Import- und/oder Exportprozesse über biologische Membranen und sind somit in der Regel membranassoziiert. SufC stellt eine cytoplasmatisch lokalisierte ATPase-Komponente dar und bildet mit SufBD den für die beschriebene Biosynthese erforderlichen Enzymkomplex aus (Watanabe *et al.*, 2005). Dieser so genannte SufBCD-Komplex weist entgegen dem klassischen Model eines ABC-Transporters keine Transmembrandomänen auf und ist als cytoplasmatisch lokalisiert beschrieben (Fontecave *et al.*, 2005). Mit hoher Wahrscheinlichkeit übernehmen diese Komplexe eine Funktion im Schutz der Zelle gegen oxidative Stress (Nachin *et al.*, 2003).

Dem steht mit Igni\_0047 ein klassischer ABC-Transporter gegenüber, für welchen sowohl eine Signalsequenz als auch sieben Transmembran-Helices vorhergesagt werden (Tabelle 9). Diese Sekundärstrukturvorhersage durch das Programm Phyre deutet auf eine Lokalisation im Bereich der Cytoplasmamembran hin, womit eine direkte Funktion des Proteins im Zusammenhang mit dem Metabolitenaustausch zwischen *I. hospitalis* und *N. equitans* denkbar ist.

Vier weitere in Tabelle 9 aufgeführte Proteine konnten nach der COG-Klassifizierung der IMG-Datenbank in die Kategorie 6, *generelle Funktion, nicht konkret analysiert*, eingeteilt werden. Darunter befinden sich das bereits beschriebene *Solute binding protein like protein* Igni\_1201, ein RND-Exporter (Igni\_1351), ein  $\text{Na}^+$ -*Solute-Symporter* (Igni\_0454), und eine membranständige Serinprotease (Igni\_1143).

Igni\_1201 wird entsprechend seiner Funktionsvorhersage als Teil eines ABC-Transporters vermutet und kann demnach als membranassoziiert oder periplasmatisch lokalisiert betrachtet werden (Elferink *et al.* 2001; Hollenstein *et al.*, 2007). Das Protein konnte bereits in früheren Analysen sowohl massenspektrometrisch (Kap. III. 3.1.1) als auch durch N-terminale Sequenzierung (Kap. III 2.4.3) identifiziert werden und enthält nach Phobius zwar eine Signalsequenz, aber keine Transmembran-Helices.

Die Familie der RND-Exporter (*resistance-nodulation-cell division*), welcher entsprechend der NCBI-Proteindatenbank das massenspektrometrisch nachgewiesene *Ignicoccus*-Protein Igni\_1351 angehört, ist im Zusammenhang mit der Resistenz Gram-negativer Bakterien gegen Zellgifte wie Antibiotika bekannt. RND-Exporter sind membranständige, hetero-oligomere Proteinkomplexe mit einer weiten Substratspezifität, welche in der Lage sind, Exportprozesse über die äußere Membran Gram-negativer Bakterien zu katalysieren und so derartige Substanzen aus der Zelle auszuschleusen (Nagakubo *et al.*, 2002; Yu *et al.*, 2003). Entsprechend der Primärstrukturdaten ist Igni\_1351 mit einer Molekularmasse von ca. 130 kDa eines der größten, im Genom von *I. hospitalis* kodierten Proteine und weist neben einem Signalpeptid elf Transmembran-Helices auf. Für das Gram-negative Bakterium *Escherichia coli* konnte gezeigt werden, dass der RND-Exporter AcrAB-TolC in der Lage ist, kombinierte Exportsysteme für diverse Substrate von der Cytoplasmamembran über das Periplasma hinweg in den Extrazellulärraum aufzubauen. Das in *I. hospitalis* nachgewiesene Protein Igni\_1351 entspricht dabei dem AcrB-Protein, welches mit 12 Transmembran-Helices in der Cytoplasmamembran verankert ist und über den periplasmatischen Raum mit dem in der äußeren Membran lokalisierten Porin TolC zusammenwirkt (Murakami *et al.*, 2002; Yu *et al.*, 2003). AcrA erfüllt eine stabilisierende Funktion zwischen den membranständigen Domänen des RND-Exporter-Systems im Periplasma. Diese Funktionalität des RND-Exporter-Systems, als Sekretionssystem über zwei Membranen könnte auch im Metabolitenaustausch zwischen *I. hospitalis* und *N. equitans* von Nutzen sein.

Das *Ignicoccus*-Protein Igni\_0454, welches nach Annotation als  $\text{Na}^+$ -*Solute-Symporter* in der Cytoplasmamembran der Zelle vorliegt, nutzt die Energie des elektrochemischen Natriumionengradienten über der Membran für den Co-Transport von Stoffen entgegen des Konzentrationsgefälles. Derartige Gradienten können beispielsweise durch die bereits beschriebene, ebenfalls in der Cytoplasmamembran lokalisierte ATP-Synthase aufgebaut werden (Reizer *et al.*, 1990 und 1994). Da die Natriumionenkonzentration in der Zelle

niedriger ist als im umgebenden Medium, könnten auf diese Weise Substrate in die Zelle importiert werden.

Diesem Transportweg entgegengesetzt fungieren zwei ebenfalls in der Zellhüllfraktion der Co-Kultur nachgewiesene Proteine des Exportsystems. Es handelt sich dabei um die Proteine Igni\_1199 (SecY) und NEQ436 (SecD), welche je eine Untereinheit eines Translokasekomplexes darstellen. Dieser Weg der Sekretion bewirkt eine koordinierte, über ein Signalpeptid gesteuerte Sekretion ungefalteter Proteinvorstufen in den extrazellulären Raum. Beide Proteine weisen mehrere Transmembrandomänen auf, welche für die Verankerung in der Cytoplasmamembran verantwortlich sind. Sowohl das porenbildende Protein SecY als auch das Bindeprotein SecD sind membranständige Komponenten des Sekretionskomplexes und bewirken die Translokation entsprechender, ungefalteter Proteinvorstufen über die Membran hinweg. Von dort aus werden die Proteine an die äußere Membran weiter transportiert oder verbleiben im periplasmatischen Raum (Albers *et al.*, 2006).

Das ebenfalls in der Fraktion der Zellhülle nachgewiesene Protein Igni\_1143 stellt entsprechend der Annotation nach NCBI ein serinproteaseartiges Protein dar und weist laut Phobius vier Transmembran-Helices auf. Derartige Proteine sind bereits für hyperthermophile Archaeen beschrieben und sind häufig membranständig oder extrazellulär lokalisiert (Cowan *et al.*, 1987; Snowden *et al.*, 1992). Möglicherweise übernimmt die Protease eine Funktion im Aufbau der Kontaktstelle und dem anschließenden Transfer von Metaboliten zwischen den Organismen, indem sie eine gezielte Auflösung der Zellhüllen beider Spezies katalysiert, um so die Interaktion zu ermöglichen.

Das *Ignicoccus*-Protein Igni\_1324 (Carbon starvation protein CstA) konnte massenspektrometrisch in der Peak-Fraktion PIV der Zellhüllfraktion der Co-Kultur nachgewiesen werden und ist der COG-Kategorie 10, *Signaltransduktion*, zugeordnet (Tabelle 9). Entsprechend der IMG-Datenbank und einer Vorhersage von 15 Transmembran-Helices in der Aminosäuresequenz ist es als membranständig zu betrachten. Die Annotation des Proteins deutet auf ein porenbildendes Membranprotein hin, welches, induziert durch Kohlenstoffmangel, eine Peptidtransportfunktion ausbildet. Entsprechend der PFAM Datenbank konnten vierzehn weitere Vertreter dieser Familie sowohl in crenarchaeellen als auch in euryarchaeellen Spezies nachgewiesen werden, was auf die weite Verbreitung dieser Struktur hinweist (Schulz und Martin *et al.*, 1991; Dubey *et al.*, 2003). Eine Bedeutung dieses Peptidtransporter im spezifischen Austausch mit *N. equitans* ist jedoch nicht auszuschließen.

Laut Annotation handelt es sich bei dem ebenfalls im Rahmen der massenspektrometrischen Analyse der Co-Kultur identifizierten Protein Igni\_1144 um eine NADH-Dehydrogenase bzw. NADH:Ubichinon Oxidoreduktase, welche nach Phobius als membranständig zu betrachten ist (8 Transmembran-Helices). Dieses Protonen-pumpende System membranständiger

Enzymkomplexe ist für die Aufrechterhaltung der Energetisierung der Cytoplasmamembran verantwortlich, indem es einen Ionengradienten über die Membran aufbaut, welcher anschließend durch die ATP Synthase für die Generierung von ATP-Molekülen genutzt werden kann.

Im Rahmen der MS-Analyse der Peak-Faktionen PI bis PV der Zellhüllfraktion konnten mit Igni\_0618, Igni\_0670 und NEQ137 drei funktionell nicht charakterisierte Proteinspezies identifiziert werden, welche entsprechend des Vorhersageprogramms FlaFind ein Klasse III / Typ IV Signalpeptid kodieren. Derartige Sequenzmotive kennzeichnen Proteine, welche für eine posttranskriptionale Translokation an oder in eine bestimmte Membran vorgesehen sind. Wie bereits in Kapitel III. 3.1.1 beschrieben wurde, ist das Protein Igni\_0670 Gegenstand aktueller Forschung und konnte durch Immunlokalisationsstudien sowohl in den Membranen als auch in den Zellanhängen von *I. hospitalis* nachgewiesen werden (Meyer, 2007). Die physiologische Funktion der Proteine Igni\_0618 und NEQ137 ist bislang ungeklärt. Durch eine ausgedehnte FlaFind-Recherche wurden in den Genomen der beiden Spezies zusätzlich zu den drei genannten Proteinen 13 (*I. hospitalis*) bzw. 2 (*N. equitans*) weitere CDS mit einem derartigen Motiv nachgewiesen.

Des Weiteren konnte im Rahmen der MS-Analyse der Zellhüllfraktion das ebenfalls bereits in Kapitel III. 3.1.1 erwähnte Protein Igni\_1366 identifiziert werden, welches als Teil einer mutmaßlichen Operonstruktur mit den Genen igni\_1367, igni\_1368 und igni\_1369 als membranassoziiert vermutet wird. Diese Annahme stützt sich sowohl auf die Annotation in der NCBI-Proteindatenbank als auch auf eine Analyse der Primärstruktur des Proteins mit dem Vorhersageprogramm TatFind, in deren Verlauf eine so genannte Tat-Sequenz (*Twin-Arginine Translocation*) identifiziert werden konnte. Derartige Sequenzmotive sind für einen gerichteten Transport von nativ gefalteten Proteinen an die Cytoplasmamembran erforderlich. Im Rahmen einer ausgeweiteten TatFind-Recherche konnten drei weitere Proteine dieses Tat-Transportsystems im Genom von *I. hospitalis* nachgewiesen werden. Die Protein-IDs und mutmaßlichen Funktionen der in den Genomen von *I. hospitalis* und *N. equitans* kodierten Proteine, welche ein charakteristisches Fla- oder Tat-Motiv zeigen, sind im Anhang tabellarisch zusammengefasst (Kap. VI. 3; Tabelle 12).

Im Rahmen der MALDI MS/MS-Analyse der beiden intensiven Proteinbanden der Peak-Faktion PV wurde je ein *I. hospitalis*- und ein *N. equitans*-Protein identifiziert. Beide sind entsprechend ihrer Annotation als cytoplasmatisch lokalisiert zu betrachten (Abbildung 32). Während die Proteinbande 1 (etwa 85 kDa) auf den Elongationsfaktor EF-2 (NEQ543) zurückzuführen ist, verwies die Analyse der Bande 2 (etwa 40 kDa) auf das bereits identifizierte Protein Igni\_0899, welches als *FAD-dependent pyridine nucleotide-disulphide oxidoreductase* annotiert ist (Kap. III. 2.1 und Kap. III. 3.1.1).

Wie bereits erwähnt, zeigte ein Sequenzabgleich des Proteins Igni\_0899 in der NCBI-Proteindatenbank signifikante Sequenzhomologien zu dem im Genom von *N. equitans* kodierten hypothetischen Protein NEQ024. Mit Hilfe einer Genom-Analyse des *I. hospitalis*-Genoms sollten sämtliche im Genom kodierten Proteine auf ähnliche Homologien überprüft werden, um Aufschluss über einen mutmaßlichen lateralalen Gentransfer zwischen *I. hospitalis* und *N. equitans* zu gewinnen.

### 3.2.5 Analysen bezüglich eines mutmaßlichen lateralalen Gentransfers

Für die Analyse eines mutmaßlichen lateralalen Gentransfers zwischen *I. hospitalis* und *N. equitans* wurde die nach JGI annotierte, öffentlich zugängliche Genomsequenz von *I. hospitalis* durch eine Blast-Recherche mit den in der NCBI Proteindatenbank geführten Sequenzen abgeglichen. Dieser Ansatz umfasste 1436 Gene (JGI, Stand 2006) und wurde in Zusammenarbeit mit Dr. Rainer Merkl am Institut für Biophysik und physikalische Biochemie der Universität Regensburg (Abt. Prof. Dr. R. Sterner) durchgeführt. Im Rahmen der Recherche wurden sämtliche CDS des *I. hospitalis*-Genoms nacheinander in die NCBI-Proteindatenbank importiert, mit den Daten verglichen und anschließend die fünf signifikantesten Treffer auf mögliche Homologien mit *N. equitans* überprüft. Der für die umfangreiche Blast-Recherche erforderliche Suchalgorithmus wurde von Nils Eric Enkler (ehem. Mitarbeiter des Institutes) programmiert.

Auf diese Weise konnten 12 Proteinspezies im Genom von *I. hospitalis* identifiziert werden, welche, bezogen auf die Gesamtproteindatenbank des NCBI, die höchste Sequenzhomologie zu proteinkodierenden Sequenzen des *N. equitans*-Genoms aufweisen. Tabelle 10 gibt einen Überblick über das Resultat der Recherche und listet die Treffer entsprechend der Protein-IDs der identifizierten *I. hospitalis*-Proteine auf. Als Kriterium für eine exakte Identifizierung der *N. equitans*-Proteine im Verlauf der Blast-Recherche diente ein signifikanter e-value von <1e-04.

Der in Kapitel III. 3.2.3 beschriebenen Proteinklassifizierung folgend, sind sechs der zwölf identifizierten *Ignicoccus*-Proteine entsprechend ihrer physiologischen Funktion den Kategorien *Replikation, Rekombination und DNA Reparatur* (Kategorie 9) bzw. *Translation, ribosomale Struktur und Biosynthese* (Kategorie 11) zuzuordnen, welche auch unter dem Überbegriff Informationsverarbeitung zusammengefasst werden können. Vier weitere Proteinspezies entfallen auf die Kategorie *hypothetische Proteine, Proteine mit unbekannter Funktion* (Kategorie 5) und je eines auf *Transport und Metabolismus von Aminosäuren* (Kategorie 1) und *Energiehaushalt* (Kategorie 4).

Tabelle 10: Vergleich der Genome von *I. hospitalis* und *N. equitans* bezüglich eines mutmaßlichen lateralen Gentransfers. [1] Einteilung der identifizierten Proteine in die elf Hauptkategorien der COG-Datenbank entsprechend der physiologischen Funktion (siehe Tabelle 8). [2] Signifikanz der Treffer mit den *N. equitans* Proteinen: e-value / Sequenzidentität in %. Im Verlauf der vorliegenden Arbeit identifizierte Proteine sind durch Fettdruck hervorgehoben.

<i>Ignicoccus hospitalis</i>		[1]	<i>N. equitans</i>	[2]
Igni_0112	hypothetical protein	9	<b>NEQ368</b>	7e-77 / 48
Igni_0145	DEAD/DEAH box helicase domain-containing protein	9	NEQ369	5e-100 / 38
Igni_0220	valyl-tRNA synthetase	11	<b>NEQ252</b>	0 / 53
Igni_0347	tyrosyl-tRNA synthetase	11	<b>NEQ389</b>	2e-147 / 62
Igni_0719	hypothetical protein	5	NEQ028	7e-13 / 23
<b>Igni_0738</b>	leucyl aminopeptidase	1	NEQ412	9e-100 / 46
<b>Igni_0899</b>	FAD-dep. pyridine nucleotide-disulphide oxidoreductase	4	NEQ024	2e-143 / 67
Igni_1092	endonuclease IV	9	NEQ077a	4e-92 / 58
Igni_1332	hypothetical protein	5	NEQ453	1e-07 / 31
Igni_1353	radical SAM domain-containing protein	11	NEQ526	3e-51 / 42
Igni_1357	hypothetical protein	5	NEQ233	8e-06 / 23
Igni_1397	hypothetical protein	5	NEQ009	5e-21 / 43

Im Rahmen der massenspektrometrischen Analyse der Zellhüllfraktion wurden zwei der in Tabelle 10 aufgelisteten *I. hospitalis*-Proteine (Igni\_0738 und Igni\_0899) und drei *N. equitans*-Proteine (NEQ368, NEQ252 und NEQ389) detektiert. Mit Ausnahme des Proteins Igni\_1332 konnte für alle in Tabelle 10 aufgeführten Proteine die höchste Sequenzähnlichkeit mit *N. equitans*-Proteinen nachgewiesen werden. Igni\_1332 zeigte zunächst die höchste Sequenzübereinstimmung mit einem zweiten *Ignicoccus*-Protein (Igni\_1239). Erst an dritter Stelle wurde das *N. equitans*-Protein NEQ453 identifiziert.

Die Ergebnisse dieser vergleichenden Genomanalyse unterstützen die Vermutung eines Austausches von Genen zwischen den Spezies *I. hospitalis* und *N. equitans* und können als Beleg für den Austausch von genetischem Material gewertet werden. Derartige Genaustausche spielen eine entscheidende Rolle in der Genomentwicklung von Mikroorganismen und sind insbesondere in symbiotischen Lebensgemeinschaften weit verbreitet (Boucher *et al.*, 2003; Hoffmeister und Martin, 2003). Als Beispiel sei das Genom der euryarchaeellen Spezies *Thermoplasma acidophilum* genannt, welches einen signifikanten Anteil bakterienähnlicher Gene aufweist. Neben diesem bakteriellen Einfluss zeigt *T. acidophilum* auf genomicscher Ebene zudem merkliche Homologien zu *Sulfolobus solfataricus*, einem Vertreter der Crenarchaeota, welcher den selben Lebensraum wie *T. acidophilum* besiedelt (Ruepp *et al.*, 2000). Auch die Hochtemperatur-Bakterien *Aquifex aeolicus* (16 %) und *Thermotoga maritima* (24 %) weisen einen auffällig hohen Anteil archaeeller Gene auf (Aravind *et al.*, 1998; Nelson *et al.*, 1999), was vermutlich ebenfalls auf lateralen Gentransfer zurückzuführen ist.

## IV Diskussion

Die archaeelle Lebensgemeinschaft aus *Ignicoccus hospitalis* und *Nanoarchaeum equitans* repräsentiert in vielerlei Hinsicht ein einzigartiges Organismensystem.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde für die Spezies *I. hospitalis* ein neuartiger Membranproteinkomplex beschrieben und biochemisch sowie biophysikalisch charakterisiert. Zum einen konnten strukturelle Gemeinsamkeiten mit cytoplasmamembranständigen Enzymkomplexen nachgewiesen werden, zum anderen belegen entsprechende immunzytologische Analysen eine Lokalisation des Proteins in der abschließenden Zellhüllschicht des Organismus, welche mit der äußeren Membran Gram-negativer Bakterien vergleichbar ist. Auf Grundlage der gewonnenen strukturellen und funktionellen Daten konnte ein Modell der mutmaßlichen Funktion der Komplexe sowohl im Verlauf der Interaktion zwischen *I. hospitalis* und *N. equitans* als auch in Bezug auf eine physiologische Bedeutung im Stoffwechsel von *I. hospitalis* erstellt werden. Dabei handelt es sich um Annahmen, welche durch elektrophysiologische Einzelkanalstudien und umfangreiche Membranproteomanalysen der Rein- und Co-Kultur bekräftigt werden konnten.

### 1 Die Rolle von Ihomp1 in Bezug auf die Interaktion zwischen *I. hospitalis* und *N. equitans*

Wie durch Recherchen in verschiedenen öffentlichen Datenbanken nachgewiesen wurde, sind für das *I. hospitalis*-Membranprotein Ihomp1 bislang weder funktionelle Beschreibungen vorhanden noch vergleichbare Proteinsequenzen bekannt. In diversen Immunlokalisationsstudien konnte gezeigt werden, dass es sich um das erste bekannte Protein einer bislang einzigartigen Membranstruktur in der Domäne der Archaeen handelt.

Immunzytologische Untersuchungen und Western-Blot-Analysen zeigen, dass die subzelluläre Lokalisation des Proteins auf die äußere Membran und in wenigen Fällen auf die membranumschlossenen Vesikel des Periplasmas beschränkt ist. Weder im Bereich des Cytoplasmas noch im Falle der Cytoplasmamembran konnten Hinweise auf ein Vorkommen dieses Proteins gefunden werden.

Ausgedehnte Immunlokalisationsstudien an den Spezies *I. islandicus* und *I. pacificus*, welche die Funktion des Wirtsorganismus für *N. equitans* nicht erfüllen können (Paper *et al.*, 2007), belegten eine *I. hospitalis*-spezifische Expression des Ihomp1-Proteins. Zudem konnten keine Hinweise auf ein Vorkommen des korrespondierenden Gens *igni\_1266* in den anderen Spezies der Gattung *Ignicoccus* erhalten werden. Diese Befunde beruhen auf Markierungsstudien an Gefrierbruchreplikas (Kap. III. 2.3.2) und präparierten Membranfraktionen (Kap. III. 2.3.1) sowie PCR-Analysen mit spezifischen *igni\_1266*-Primern (Kap. III. 2.3.3). Die Resultate der Immunmarkierungen und PCR-Studien bestätigen die Ergebnisse

früherer Arbeiten, welche anhand von vergleichenden 2D-SDS-PAGE-Experimenten bereits ein spezies-spezifisches Auftreten des Ihomp1-Proteins andeuteten (Burghardt, 2005). Eine Analyse des *I. hospitalis* Genoms weist entsprechend der NCBI-Proteindatenbank auf ein sehr kompaktes Genom mit wenigen nichtkodierenden Gensequenzen hin. Die IMG-Genomdatenbank (Markowitz *et al.*, 2006) nennt lediglich zwölf mutmaßliche, so genannte Pseudogene, was einem prozentualen Anteil am Gesamtgenom von 0,8 % entspricht. Im Vergleich dazu sei der Laborstamm *E. coli* K12 genannt, welcher einen deutlich höheren Pseudogen-Anteil von 3,22 % aufweist. Eine fehlende Expressionsaktivität in den Spezies der Gattung *Ignicoccus*, wie im Falle des Proteins Ihomp1, ist demnach, analog zu den Daten der PCR-Analyse, mit hoher Wahrscheinlichkeit auf das Fehlen des entsprechenden Gens zurückzuführen.

Nachdem die äußere Membran von *I. hospitalis* elektronenmikroskopischen Analysen zufolge an der Ausbildung der Interaktionsstelle zwischen *N. equitans* und seinem Wirt beteiligt ist (Rachel *et al.*, 2002; Junglas *et al.*, 2008; Wasserburger *et al.*, 2008), ist eine Funktion dieser *I. hospitalis*-spezifischen Proteinkomplexe in Bezug auf die Erkennung des Wirtes und die Ausbildung einer Kontaktstelle denkbar. Die gleichmäßige Verbreitung von Ihomp1 auf der gesamten Oberfläche der Zelle bekräftigt diese Vermutung, da sie eine derartige Kontaktaufnahme begünstigen würde. Eine direkte Beteiligung des Ihomp1-Membranproteins am Stoffaustausch zwischen den Spezies in seiner Gestalt als Pore ist nicht auszuschließen, jedoch deuten aktuelle elektronenmikroskopische und genomische Analysen auf einen membranfusionsvermittelten oder direkten Austausch zwischen *I. hospitalis* und *N. equitans* hin. So konnten von B. Junglas und N. Wasserburger bislang mindestens drei verschiedene Phasen der Zell-Zell-Interaktion beschrieben werden. Diese lassen sich so interpretieren, dass es neben einem Stadium der Kontaktaufnahme auch mindestens zwei Stadien des Stoffaustausches gibt (Junglas *et al.*, 2008, Wasserburger, 2008). Zudem konnten in den Genomen sowohl von *I. hospitalis* als auch von *N. equitans* nur wenige potenzielle Membrantransporter identifiziert werden, welche meist eine limitierte Substratspezifität aufweisen (Waters *et al.*, 2003; Burghardt *et al.*, 2008). Daher erscheint ein regulierter Austausch von Metaboliten und Proteinen zwischen den Zellen unter Verwendung spezifischer, transmembranständiger Transportsysteme eher unwahrscheinlich. Die aktuellen elektronenmikroskopischen Daten deuten vielmehr auf einen transienten Stoffaustausch zwischen den Zellen unter Einbeziehung des Cytoplasmas oder der vom Cytoplasma abgeschnürten Vesikelstrukturen hin (Junglas *et al.*, 2008; Wasserburger, 2008). Diese Form des membranfusionsvermittelten Austauschs stellt vermutlich die Vorstufe zu einer weiteren Phase des Stoffaustausches dar. Diese könnte, zumindest phasenweise, entsprechend aktueller elektronenmikroskopischer Daten nach Auflösung des Protein-S-Layers von *N. equitans* und Verschmelzung der Membranen, zur Ausbildung eines direkten Kontaktes der

Cytoplasmata beider Organismen führen, wodurch dann ein konstanter Stoffaustausch über eine Plasmabrücke möglich wäre (Junglas et al., 2008; Wasserburger, 2008). Dieses Austauschmodell ist mit den Erkenntnissen früherer Arbeiten vereinbar, welche belegen, dass *N. equitans* sowohl Lipide als auch Aminosäuren von seinem Wirt bezieht (Jahn et al., 2004; Jahn et al., 2008; Gallenberger, 2008). Ein solcher Austausch könnte über die beschriebenen vesikelvermittelten Membranfusionsereignisse oder Plasmabrücken organisiert sein.

Dieses Modell steht im Einklang mit den Ergebnissen einer umfangreichen massenspektrometrischen Analyse der Membranfraktionen der Rein- und Co-Kultur, welche die Expression von mehr als 280 in den Genomen von *I. hospitalis* und *N. equitans* annotierten Proteinspezies nachweisen konnte (Kap. III. 3). Entsprechend der physiologischen Funktion handelt es sich bei einem Großteil der identifizierten und funktionell charakterisierten Proteinspezies um cytoplasmatische Proteine, welche in Prozesse der Energiegewinnung und der Informationsverarbeitung eingebunden sind (Kap. III. 3.2.3). Demgegenüber steht, analog zu den erwähnten Genomanalysen beider Spezies, ein geringer Anteil an mutmaßlichen Transportern (12 %), welche entsprechend der Annotation als uncharakterisiert oder cytoplasmamembranständig gelten (Kap. III. 3.2.4).

Während mit der cytoplasmamembranständigen RND-Exporter-Komponente Igni\_1351 ein Baustein eines potenziellen Transporters in *I. hospitalis* nachgewiesen werden konnte, welcher eine mehr oder weniger unspezifische Translokation von Substraten sowohl über die Cytoplasmamembran als auch die äußere Membran vermitteln könnte (Yu et al., 2003; Murakami et al., 2004), handelt es sich bei den übrigen identifizierten und annotierten Membranproteinen im Wesentlichen um klassische Enzyme des Energiehaushaltes (ATP-Synthasen und (De)-Hydrogenasen) oder des Stoffaustausches zwischen Cytoplasma und Periplasma (ABC-Transporter) (Tabelle 9). Zudem konnten neben den dominierenden Oberflächenproteinen von *I. hospitalis* (Ihomp1) und *N. equitans* (S-Layer-Protein NEQ300) drei Vertreter der CDC48/p97-Proteinfamilie sowie Komponenten des Sekretionssystems nachgewiesen werden, welche unter anderem in Prozesse der Membran- oder Vesikelfusion (CDC48/p97; Latterich et al., 1995; Rabouille et al., 1995; Rockel et al., 1999) als auch in den gerichteten Transport gefalteter oder ungefalteter Proteine aus dem Cytoplasma an die Membranen oder in den extrazellulären Raum eingebunden sind (Proteine des Sec-, Fl- und Tat-Translokationssystems; Albers et al., 2003 und 2006; Ring und Eichler, 2004; Pohlschröder et al., 2005). Diesen Proteinen könnte im Zusammenhang mit der gezielten Versorgung der äußeren Membran aus dem Cytoplasma eine tragende Rolle zukommen, welche im Falle der Interaktion mit *N. equitans* gezielt oder ungezielt von diesem ausgenutzt werden könnte. Durch die Generierung spezifischer, polyklonaler Antikörper und Immun-

markierungsstudien an Serienschnitten, könnten nähere Informationen über die subzelluläre Lokalisation dieser Proteine gewonnen werden.

Vor dem Hintergrund des Modells eines vesikel- oder membranfusionsvermittelten Austausches und den genannten elektronenmikroskopischen Daten ist eine Beteiligung des funktionell bislang uncharakterisierten Membranproteins Ihomp1 am Stoffaustausch als Proteintransporter unwahrscheinlich. Unabhängig von der physiologischen Bedeutung in *I. hospitalis* konnten jedoch Hinweise auf eine Funktion des Proteins im Verlauf der Kontaktaufnahme zwischen *I. hospitalis* und *N. equitans* gefunden werden. Neben dem markanten wirtsspezifischen Auftreten des Proteins konnte im Rahmen nativer, gelchromatographischer Analysen eine mutmaßliche Protein-Protein-Interaktion zwischen Ihomp1 und dem dominierenden Oberflächenprotein von *N. equitans*, dem S-Layer-Protein NEQ300, nachgewiesen werden. Dieser Befund bestätigt frühere Immunlokalisationsstudien an Ultradünnsschnittpräparaten, welche sowohl Ihomp1 als auch NEQ300 im Bereich der Kontaktstelle identifizieren konnten, weshalb sie als Leitproteine dieser Struktur gelten (Gürster, 2007; Junglas, 2006; Wasserburger, 2008; C. Meyer, unveröffentlicht). Beide Proteine konnten im Anschluss an eine aufwendige Präparation, bestehend aus einem harschen Zellaufschluss, einer Dichtegradienten-Zentrifugation mit darauf folgender Solubilisierung der Membranfraktion sowie einer gelchromatographischen Auftrennung der so gelösten Membranproteine- und Proteinkomplexe, in derselben Gelfiltrations-Fraktion nachgewiesen werden (Kap. III. 3.2.2). Vor dem Hintergrund der deutlich höheren Molekularmasse des 100 kDa großen S-Layer-Monomers NEQ300 im Vergleich zu den Monomeren des Ihomp1-Proteins (6,23 kDa) bzw. dessen stabilen Oligomerformen (45 und 50 kDa), deutet eine Co-Lokalisation zweier derart ungleicher Proteinspezies in einer Gelfiltrations-Fraktion auf eine Organisation in Form eines nativen Proteinkomplexes hin. Entsprechend des Elutionsvolumens der Fraktion in der Gelfiltration handelt es sich um einen 400 bis 500 kDa großen Multiproteinkomplex. Neben den beschriebenen Proteinspezies NEQ300 und Ihomp1, konnte unter anderem auch das S-Layer-assozierte Protein NEQ236 in dieser Fraktion nachgewiesen werden (Kap. III. 3.2.4). NEQ236 ist für die Verankerung des S-Layers von *N. equitans* in der Cytoplasmamembran verantwortlich und durch nicht kovalente Verbindungen mit dem S-Layer-Protein NEQ300 assoziiert (Schuster, 2003; Gürster, 2007). Der Nachweis dieses Proteins, gemeinsam in einer Fraktion mit NEQ300 und Ihomp1, deutet auf den Erhalt dieser nicht kovalenten Verbindungen hin und bekräftigt die Annahme einer Interaktion zwischen den beiden dominierenden Oberflächenproteinen der beiden Archaeen. Eine Funktion des *I. hospitalis*-spezifischen Ihomp1-Proteins in Form eines Erkennungs-/Bindemotivs für *N. equitans* über dessen S-Layer-Protein würde die fehlende Wirtstauglichkeit der anderen Spezies der Gattung *Ignicoccus*, *I. islandicus* und *I. pacificus*, erklären. Dem Protein Ihomp1 könnte demnach eine

entscheidende Funktion in der Initiation und Erhaltung der einzigartigen Zell-Zell-Interaktion zwischen den hyperthermophilen Archaeen *I. hospitalis* und *N. equitans* zukommen.

## 2 Physiologische Bedeutung von Ihomp1 in *I. hospitalis*

Wie durch massenspektrometrische Analysen und Immunmarkierungsstudien gezeigt werden konnte, sind sowohl die Expression von Ihomp1 als auch dessen hochfrequentes Auftreten in der äußeren Membran von *I. hospitalis* von einem Wachstum in Co-Kultur mit *N. equitans* unabhängig. Demnach erfüllt das Protein, neben seiner mutmaßlichen Funktion im Aufbau der spezifischen Interaktionsstelle mit *N. equitans*, vermutlich eine weitere grundlegende physiologische Aufgabe im Stoffwechsel von *I. hospitalis*.

Während eine Analyse der Primärstruktur des Ihomp1-Proteins keine bekannten katalytischen Domänen in der Aminosäuresequenz erkennen ließ und somit keine Rückschlüsse auf eine mögliche Funktionalität des Proteins möglich waren, konnte mit Hilfe bioinformatischer und experimenteller Studien eine signifikante, hydrophobe Transmembrandomäne im Bereich des N-Terminus von Ihomp1 identifiziert werden (Kap. III. 2.5 und 2.6). Dieser Befund steht im Einklang mit den erwähnten Immunmarkierungsstudien, welche eine membranständige Lokalisation des Proteins in der äußeren Membran von *I. hospitalis* belegen (Burghardt *et al.*, 2007).

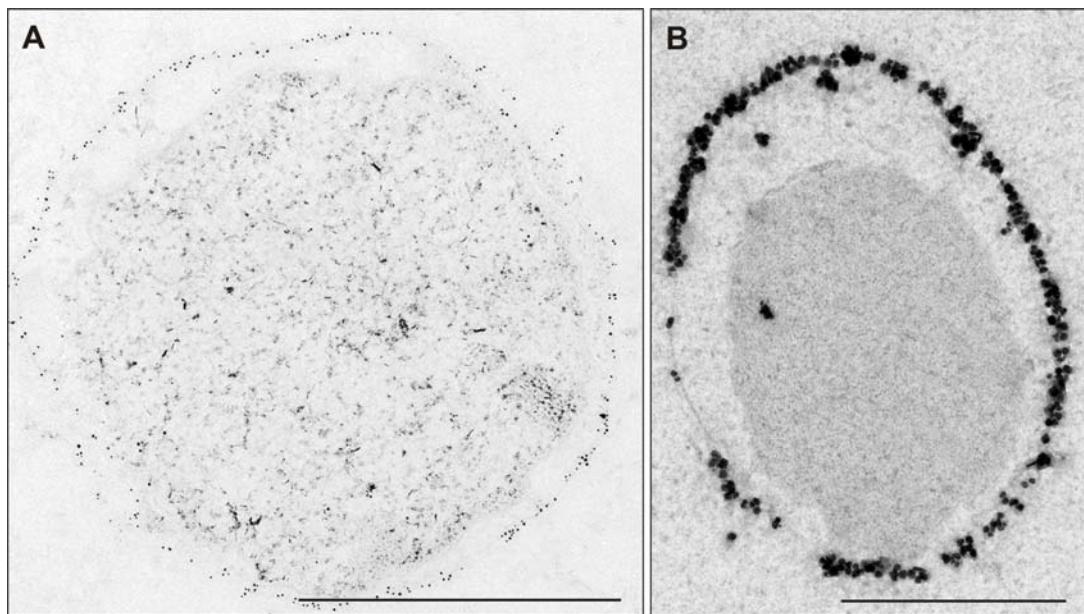
### Die Ihomp1-Komplexe als funktionelle Einheit der 7 nm-Partikel der äußeren Membran

Entsprechend diverser elektronenmikroskopischer Untersuchungen an Gefrierbruchreplikas und Ultradünnenschnittpräparaten weist die äußere Membran zwei markante und deutlich unterscheidbare Protein-Komplexe auf (Rachel *et al.*, 2002). Dabei handelt es sich zum einen um dicht gepackte, in quasikristalliner Form auftretende 7 nm-Partikel und zum anderen um eine größere Struktur mit einem Gesamtdurchmesser von 24 nm, welche deutlich seltener auftritt. Zwar konnten bereits einige strukturelle Daten für die 24 nm-Komplexe gewonnen werden (Rachel und Näther, unveröffentlicht), über die am Aufbau dieser Struktur beteiligten Proteine ist bislang jedoch nichts bekannt. Wie durch elektronenmikroskopische Untersuchungen und tomographische Rekonstruktionen der 7 nm-Partikel an negativ kontrastierten Fragmenten der äußeren Membran von *I. hospitalis* gezeigt werden konnte, handelt es sich dabei um eine membran durchspannende Struktur, welche eine zentrale Pore von 2 nm ausbildet (Burghardt *et al.*, 2007). Entsprechend der weiten Verbreitung dieser Struktur auf der Oberfläche von *I. hospitalis* wurde bereits in früheren Arbeiten eine Korrelation zwischen den 7 nm-Partikeln und dem dominierenden Protein der äußeren Membran, Ihomp1, als strukturgebender Proteinspezies vermutet (Burghardt, 2005). Neben dem dominierenden Auftreten des Proteins war diese Annahme zudem auf dem

charakteristischen Oligomerisierungsverhalten des Ihomp1-Monomers (6,23 kDa) begründet. So konnte gezeigt werden, dass Ihomp1 extrem stabile, homooligomere Komplexe mit einer Masse von 45 und 50 kDa ausbildet, welche als die strukturgebende, funktionelle Einheit der 7 nm-Partikel vermutet wurden (Burghardt, 2005).

Im Rahmen einer massenspektrometrischen Analyse mittels LILBID-MS konnte eine einheitliche Stöchiometrie für die 45 und 50 kDa Ihomp1-Komplexe bestimmt werden, welche somit als zwei verschiedene Faltungs- bzw. Modifikationsformen eines Oligomers zu betrachten sind. Es handelt sich um homodecamere Strukturen, deren Architektur auf nichtkovalenten Interaktionen beruht (Kap. III. 2.7.1). Infolge dieser experimentell ermittelten Stöchiometrie der Komplexe wurde das im Jahr 2007 publizierte, im Wesentlichen auf theoretischen Überlegungen basierende Nonamermodell, widerrufen (Burghardt *et al.*, 2007). Die Dimensionen des Ihomp1-Homodecamers stehen im Einklang mit den tomographischen Daten der 7 nm-Partikel. Die Abweichung zwischen der berechneten Molekularmasse des Ihomp1-Homodecamers (62,3 kDa) und den experimentell bestimmten, apparenten Werten der stabilen Homooligomere (45 und 50 kDa) könnte auf das im Vergleich zu löslichen Proteinen ungeordnete Laufverhalten von Membranproteinen in der SDS-Gelelektrophorese zurückzuführen sein (Hunte *et al.*, 2003). Die experimentell bestimmte Anzahl der am Aufbau eines 7 nm-Partikel beteiligten Ihomp1-Monomere deckt sich gut mit den Dimensionen der Porenstruktur. So sind neun bis zehn Monomere erforderlich, um eine 2 nm weite und 5 nm tiefe Pore aufzuspannen (Burghardt *et al.*, 2007).

Die Vermutung einer Verbindung zwischen dem dominierenden Protein und der dominierenden Struktur der äußeren Membran von *I. hospitalis* konnte im Rahmen der vorliegenden Arbeit auch mit Hilfe spezifischer Markierungen an Gefrierbruchreplikas bekräftigt werden (Kap. III. 2.3.2) und steht im Einklang zu den Ergebnissen umfangreicher Immunlokalisationsstudien an Ultradünnnschnittpräparaten (Junglas, 2006; Burghardt *et al.*, 2007). Die in Abbildung 34 dargestellten Markierungsstudien wurden von Benjamin Junglas im Rahmen einer Diplomarbeit angefertigt und weisen auf eine hochfrequente Markierung der äußeren Membran durch den anti-Ihomp1 Antikörper hin. Die Häufigkeit dieser spezifischen Markierung, welche anhand von schwarz erscheinenden Goldkörnern verfolgt werden kann, entspricht der Dominanz der 7 nm-Partikel, sodass von einem direkten Zusammenhang zwischen dieser Struktur und dem dominierenden Membranprotein der Zellhülle auszugehen ist (Burghardt *et al.*, 2007).



**Abbildung 34: Subzelluläre Lokalisation von Ihomp1 in *Ignicoccus hospitalis*.** Immunmarkierung an Ultradünnschnittenpräparaten nach Kultivierung in Cellulosekapillaren, Hochdruckgefrierung und Gefriersubstitution in EGFU. Für die Markierung wurde der sekundäre goat anti-rabbit IgG Antikörper verwendet gekoppelte mit (A) 6nm Gold bzw. (B) *Ultrasmall* Gold mit anschließender Silberverstärkung. Balken 1  $\mu$ m. Abbildung aus Burghardt *et al.*, 2007

Aufgrund ihrer exponierten Lage in der abschließenden Zellhüllschicht und entsprechend der porenenformenden Geometrie, könnte den Ihomp1-Komplexen / 7 nm Partikeln somit eine Funktion in der Versorgung der Zelle mit Nährstoffen zukommen.

#### Physiologische Bedeutung der Ihomp1-Komplexe in der äußeren Membran

Entgegen dem klassischen Aufbau der archaeellen Zellhülle aus einer Cytoplasmamembran, einem schmalen periplasmatischen Spalt und einem abschließenden Protein-S-Layer (Kandler und König, 1998), zeigt die Zellhülle der Gattung *Ignicoccus* eine einzigartige Architektur, die durch das Auftreten der bereits genannten äußeren Membran als abschließender Zellhüllschicht gekennzeichnet ist (Rachel *et al.*, 2002). Diese spannt einen ungewöhnlich weiten periplasmatischen Raum von 20 bis 400 nm um das Cytoplasma auf, sodass eine Form der Kompartimentierung in der *Ignicoccus*-Zelle entsteht, welche zu einer Distanzierung des Cytoplasmas von dem umgebenden Medium führt.

Wie entsprechend der öffentlich zugänglichen Genomdaten zu vermuten ist, dürften die zentralen energieliefernden Reaktionen in *I. hospitalis*, analog zu anderen Archaeen und Bakterien, im Bereich der Cytoplasmamembran stattfinden. So konnten mit Hilfe von Genomanalysen eine Reihe von klassischen, typischerweise cytoplasmamembranständigen Enzymen und Enzymkomplexen für *I.hospitalis* identifiziert werden. Beispielsweise kodiert das Genom neben sechs löslichen auch zwei cytoplasmamembranständige Untereinheiten

der ATP-Synthase, welche unter Ausnutzung elektrochemischer Gradienten die Bildung von ATP katalysiert. Davon ausgehend, dass es sich im Falle der Cytoplasmamembran um eine energetisierte Lipidschicht handelt, ist in Anbetracht des beschriebenen ungewöhnlich weiten periplasmatischen Raumes eine Versorgung der Cytoplasmamembran mit den erforderlichen Nährstoffen im Vergleich zu anderen Prokaryonten erschwert. Während das Periplasma anderer prokaryotischer Spezies als Speicherort für spezifisch sekretierte Makromoleküle dient, welche sowohl in den Transport und die Degradation von Nährstoffen als auch in den Export und die Faltung von Proteinen eingebunden sind (Phipps *et al.*, 1991; Graham *et al.*, 1991; Ring und Eichler, 2004), ist die Zusammensetzung und Funktion dieses Zwischenraumes in *Ignicoccus* nicht geklärt.

Vor dem Hintergrund des bereits beschriebenen asymmetrischen Aufbaus der äußeren Membran von *I. hospitalis* ist, basierend auf der daraus hervorgehenden, mutmaßlichen Ungleichverteilung von Lipiden und Proteinen im äußeren und inneren Blatt der Membran, ein schwaches, intrinsisches Membranpotential über diesen Bilayer vorstellbar. Die elektronenmikroskopischen Daten von D. Näther und R. Rachel (2004) anhand von Ultra-dünnchnittpräparaten ließen in einigen Fällen sowohl eine Aufspaltung des Bilayers zwischen dem äußeren und inneren Blatt als auch eine unterschiedlich starke Kontrastierung der Blätter erkennen. Diese Daten konnten im Rahmen der vorliegenden Arbeit durch funktionelle Studien und Immunlokalisationsstudien für das Protein Ihomp1 bekräftigt werden. So konnten durch elektrophysiologische Leitfähigkeits-Analysen Hinweise auf eine Unidirektionalität der Ihomp1-Porenkomplexe in künstlichen Membranen erhalten werden (Kap. III. 2.7.3), was eine definierte Ausrichtung der Struktur in der äußeren Membran von *I. hospitalis* vermuten lässt. Bioinformatischen Vorhersagen zufolge ist von einer *Outside-Inside* Orientierung der Ihomp1-Monomere bzw. des gesamten Ihomp1-Komplexes auszugehen (Kap. III. 2.5). Unterstützt wird dieses Modell einer gerichteten Orientierung der Ihomp1-Komplexe durch Markierungsstudien an Gefrierätzpräparaten intakter *I. hospitalis*-Zellen: während das äußere Blatt eine starke Markierung aufweist, konnten im Bereich des inneren Blattes der äußeren Membran keine Bindungen des Ihomp1-Antikörpers beobachtet werden (Kap. III. 2.3; Abbildung 11A). Inwiefern diese strukturelle und funktionelle Asymmetrie der äußere Membran tatsächlich ein intrinsisches Membranpotential hervorruft und ob dieses für die Zelle nutzbar ist, ist für *I. hospitalis* nicht bekannt. Vergleichbare elektrophysiologische Eigenschaften sind bereits für die äußere Membran Gram-negativer Bakterien beschrieben, diese basieren jedoch auf einer Lipid-Asymmetrie in den Blättern der Membran, welche unterschiedliche Oberflächenladungen hervorruft (Hall und Latorre, 1976; Wiese *et al.*, 1996).

Die äußere Zellhüllschicht von *I. hospitalis* ist in ihrer Lipidzusammensetzung deutlich von der äußeren Membran Gram-negativer Bakterien zu unterscheiden und zeigt vielmehr

Ähnlichkeiten zu prokaryontischen S-Layer-Strukturen, welche in Analogie zur äußeren Membran von *I. hospitalis* bei vielen archaeellen und bakteriellen Spezies als äußere Abgrenzung beschrieben werden (Engelhardt und Peters, 1998). Während es sich bei der äußeren Membran von *I. hospitalis* nicht um einen S-Layer, sondern um eine biologische Membran mit signifikantem Lipidanteil handelt (Jahn *et al.*, 2004), erinnert insbesondere das häufige Auftreten der 7 nm-Partikel auf der Oberfläche von *I. hospitalis* sowie deren Transmembranporen-formende Struktur stark an die ultrastrukturellen Merkmale prokaryotischer S-Layer. Es handelt sich um monomolekulare Oberflächenschichten aus einer (Glyko-) Proteinspezies, deren Untereinheiten zweidimensionale, kristalline, 5 bis 25 nm dicke Hüllstrukturen ausbilden (Sleytr und Messner, 1988). Je nach Spezies stehen unterschiedlich viele dieser Monomere über kovalente oder nichtkovalente Verbindungen miteinander in Kontakt und bilden eine morphologische Einheit mit Poren von 2 bis 8 nm im Durchmesser aus (Engelhardt und Peters, 1998; Phipps *et al.*, 1991; Sára und Sleytr, 2000). Mit Hilfe elektronenmikroskopischer Analysen konnte eine quasikristalline Ordnung für die 7 nm-Partikel bestimmt werden, welche wie erwähnt, analog zu den morphologischen Einheiten des S-Layers, eine durchgehende Pore in der Membran ausbilden (Rachel *et al.*, 2002; Burghardt *et al.*, 2007). Die Poren der äußeren Membran von *I. hospitalis* weisen mit 2 nm einen vergleichbaren Durchmesser auf und treten dabei in ähnlich hoher Anzahl zu den Poren der morphologischen Einheiten der S-Layer auf, welche bis zu 70 % der Zelloberfläche einnehmen können (Sára und Sleytr, 2000). Nachdem es sich in beiden Fällen um die abschließende Zellhüllschicht handelt, welche den periplasmatischen Raum über der Cytoplasmamembran aufspannt und diese so von dem umgebenden Medium abtrennt, könnten die 7 nm-Partikel eine zu den S-Layer-Poren ähnliche Funktion tragen. Während S-Layer in ihrer Architektur und Biochemie bereits eingehend untersucht sind, ist über ihre spezifische Funktionalität nur wenig bekannt. Es wird vermutet, dass sie neben einer Stütz- und Schutzfunktion (Engelhardt, 2007b) eine entscheidende Rolle in der Anheftung von Mikroorganismen an Oberflächen oder andere Zellen einnehmen (Baumeister und Hegerl, 1986; König, 1988). Des Weiteren wird ihnen eine Funktion als Molekularsieb zugeschrieben (Sára und Sleytr, 1987; Sára und Sleytr, 2000). Eine solche Funktionalität als Kanal zwischen dem extrazellulären Raum und dem Periplasma ist auch für die 7 nm-Partikel der äußeren Membran von *I. hospitalis* denkbar. So könnten diese eine Verbindung zum Medium herstellen und damit beispielsweise die Versorgung der Zelle mit dem terminalen Elektronenakzeptor Schwefel der Atmungskette gewährleisten. Eine solche Funktionalität im Zusammenhang mit der Sekretion von Proteinen und der Nährstoffversorgung ist bereits für den S-Layer des hyperthermophilen Archaeums *Pyrobaculum organotrophum* beschrieben (Sára und Sleytr, 2000; Phipps *et al.*, 1991).

Dieser strukturelle und funktionelle Vergleich der 7 nm-Partikel mit den definierten Poren der prokaryotischen S-Layer deckt sich mit biophysikalischen Einzelkanalstudien. Diese belegen eine signifikante Leitfähigkeit für die funktionelle Einheit der 7 nm-Partikel mit einem konstanten Wert von 120 pS über einen weiten Spannungs- ( $\pm 20$  bis  $\pm 160$  mV) und pH-Bereich (5,5 bis 7,5) hinweg (Kap. III. 2.7.3). Die Ihomp1-Pore wird vermutlich nur durch ihre Dimension und Orientierung in der Membran beeinflusst. Die Resultate der tomographischen Rekonstruktion der äußeren Membran, ermöglichen durch einen virtuellen Membran-Vertikalschnitt eine Vermessung der Pore der 7 nm-Partikel (Burghardt *et al.*, 2007). Anhand der Ergebnisse bioinformatischer Primärstrukturanalysen konnte im Transmembranverlauf weder eine katalytische Domäne noch eine Ligandenbindestelle identifiziert werden, welche auf eine signalabhängige, oder anderweitig regulierte Funktionalität hinweisen würde. Die Pore weist über den gesamten Transmembranbereich einen konstanten Durchmesser von 2 nm auf und könnte eine physiologische Bedeutung als Diffusionsbrücke über die äußere Membran einnehmen. Für eine eindeutige Aussage bezüglich der Geometrie der Ihomp1-Pore und einer mutmaßlichen Ionenselektivität oder Protonensensitivität sind jedoch hochauflösende strukturelle Untersuchungen und weiterführende physiologische Einzelkanalstudien unverzichtbar. Dabei wäre eine Untersuchung der Pore in Bezug auf eine mutmaßliche Protonenbarriere-Funktion im Zusammenhang mit den erwähnten Energetisierungsstudien der äußeren Membran von besonderem Interesse.

Im Kontrast zu einer passiven Diffusion und Unspezifität steht die experimentell bestimmte Unidirektionalität der Pore, welche bei abrupten Polaritätswechseln des Spannungsfeldes im Rahmen der elektrophysiologischen Messungen zum Ausdruck kommt (Kap. III. 2.7.3). Diese ist vermutlich auf die bioinformatischen Analysen zufolge vorherrschende *Outside-Inside* Orientierung der Ihomp1-Monomere bzw. des gesamten Ihomp1-Komplexes zurückzuführen (Kap. III. 2.5). Während der kurze N-Terminus des Proteins in den Extrazellulärraum ragt, ist der deutlich längere C-Terminus dem Periplasma zugewandt. Bei der Ausbildung der homodecameren Ihomp1-Porenkomplexe ist eine elektrostatische Interaktion der C-Termini der Monomere in Form einer übergeordneten Tertiärstruktur denkbar, was die beschriebene Unidirektionalität der Pore hervorrufen könnte. Die Analyse der Primärstruktur des Ihomp1-Monomers machte deutlich, dass lediglich drei positiv und zwei negativ geladene Aminosäurereste in der prozessierten Form des Proteins vorliegen. Dabei ist eine der positiven Ladungen im Bereich des C-terminalen Endes der mutmaßlichen Transmembrandomäne lokalisiert, während die übrigen geladenen Aminosäurereste des Proteins C-Terminal außerhalb der Transmembrandomäne lokalisiert sind und möglicherweise untereinander interagieren. Über das Faltungsverhalten der über vierzig Aminosäuren langen, C-terminalen Domäne des Proteins liegen bislang keinerlei Informationen vor. Eine Funktion der beschriebenen Ladungen im Zusammenhang mit der

Bildung der Ihomp1-Komplexe ist nicht auszuschließen. Die geladenen Aminosäuren könnten in Form einer nichtkovalenten Verbindung zu der Ausbildung der Ihomp1-Komplexe beitragen, welche vermutlich im Wesentlichen auf hydrophoben Interaktionen zwischen den mutmaßlichen Transmembrandomänen der Monomere beruht. Derartige, nicht kovalent verbundene, homooligomere Ringstrukturen sind beispielsweise für die membranständige Rotorregion der bakteriellen  $F_1F_0$ -ATP-Synthasen bekannt, welche eine Ionentranslokation über die Cytoplasmamembran vermitteln (Stock *et al.*, 1999; Stahlberg *et al.*, 2001; Mitome *et al.*, 2004; Meier *et al.*, 2005).

Versuche, diese theoretischen Befunde mit Hilfe einer Röntgenkristallstrukturanalyse zu bekräftigen und so nähere Einblicke in die Geometrie der Porenregion zu gewinnen, blieben bislang ohne Erfolg. Zwar konnten bereits beugende Ihomp1-Proteinkristalle gewonnen werden, jedoch ist die Qualität der Beugungsdaten mit einer maximalen Auflösung von 7 Angström für eine hochauflösende Strukturaufklärung bislang nicht ausreichend (Kap. III. 2.7.2). Neben einer Weiterführung dieser Röntgenkristallstrukturstudien wäre zu diesem Zweck auch eine (cryo-)elektronenkristallographische Untersuchung von zwei-dimensionalen Ihomp1-Kristallschichten denkbar. Mit Hilfe dieser Technik konnten bereits Auflösungen im atomaren Bereich von 4 bis 6 Angström erzielt werden (Jap *et al.*, 1991; Williams *et al.*, 1999). Während die Technik damit im Vergleich zur den Röntgenkristallstruktur (bis 1 Angström) weniger hoch aufgelöste Strukturdaten liefert, ist die Generierung insbesondere von zwei-dimensionalen Membranprotein-Kristallen in planaren Lipidschichten vereinfacht (Walz und Grigorieff, 1998).

#### Physiologische Bedeutung der Ihomp1-Komplexe in *I. hospitalis*

Entsprechend der Organismenbeschreibung handelt es sich bei der Spezies *I. hospitalis* um ein marines, chemolithoautotrophes Archaeum, welches die Reduktion von elementarem Schwefel mit molekularem Wasserstoff als Energiequelle nutzt und seinen Kohlenstoffbedarf über einen neuartigen  $CO_2$ -Fixierungsweg deckt (Paper *et al.*, 2007; Jahn *et al.*, 2007; Huber *et al.*, 2008).

Nachdem zentrale Stoffwechselprozesse an eine energetisierte Membran gebunden sind, wie sie vermutlich zumindest die Cytoplasmamembran darstellt, wäre für die primäre Versorgung der Zelle eine ausreichende Zufuhr mit Wasserstoff, Kohlendioxid und gelöstem Schwefel, als terminalem Elektronenakzeptor, über die äußere Membran erforderlich. Ein Teil der im Medium vorliegenden, unlöslichen  $S_8$ -Ringe des Schwefels werden dabei unter der Einwirkung der hohen Umgebungstemperaturen und einem leicht sauren pH-Milieu, welches im natürlichen Habitat der Gattung *Ignicoccus* vorherrscht, aufgebrochen, sodass lösliche Polysulfide ( $S_n^{2-}$ ) unterschiedlicher Kettenlänge entstehen. Diese Ketten können eine

Länge von bis zu 200 S<sub>8</sub>-Untereinheiten erreichen, unter den thermischen und reduzierenden Umgebungsbedingungen jedoch auch selbstständig dissoziieren.

Für die Energiegewinnung aus der Reduktion des Schwefels bzw. Polysulfids sind neben membranständigen Hydrogenasen und einer Elektronentransportkette auch Schwefelreduktasen erforderlich. Während das Genom von *I. hospitalis* zwei membranständige Schwefel bzw. Polysulfid-Reduktasekomplexe kodiert, war der Nachweis eines periplasmatischen Polysulfid-Transporters nicht möglich. Derartige Transporter vermitteln in anderen schwefelreduzierenden Mikroorganismen, wie dem Gram-negativen Bakterium *Wolinella succinogenes*, den Transfer des Polysulfides aus dem extrazellulären Medium an die Cytoplasmamembran (Klimmek *et al.*, 1998). *I. hospitalis* repräsentiert den einzigen crenarchaeellen Vertreter, der kein Gen dieser Transporterfamilie aufweist. Möglicherweise ist das Fehlen dieses Transporters auf das Wachstum des Organismus in einem polysulfidreichen Umfeld zurückzuführen, verursacht durch die thermischen und reduzierenden Bedingungen des Habitats, so dass eine einfache Diffusion der Polysulfide über den periplasmatischen Raum zu den cytoplasmamembranständigen Reduktasen eine ausreichende Versorgung gewährleisten könnte. In diesem Zusammenhang könnten die Ihomp1-Porenkomplexe der 7 nm-Partikel in Form eines Polysulfid-Kanals den Zugang zum Periplasma ermöglichen. Die Annahme einer solchen Funktion wird durch den Nachweis der spezifischen Leitfähigkeit für die Ihomp1-Komplexe im Rahmen elektrophysiologischer Einzelkanalstudien an artifiziellen Membranen bekräftigt (Kap. III. 2.7.3). So konnte anhand nativ aufgereinigter Ihomp1-Fraktionen, wie erwähnt, eine konstante, signifikante Leitfähigkeit von 120 pS über einen weiten Spannungsbereich hinweg bestimmt werden, was die porenbildenden Eigenschaften des Proteins bestätigt und auf eine möglicherweise unspezifische Pore schließen lässt.

Obwohl dieser Wert für die Leitfähigkeit der 7 nm-Partikel im Vergleich zu den ebenfalls in der Zellhülle lokalisierten Transmembranporen-formenden Porinen der äußeren Membran Gram-negativer Bakterien im Durchschnitt um etwa ein Zehntel niedriger ist (Benz *et al.*, 1985), ist eine Funktion im Transfer von Polysulfiden in den periplasmatischen Raum der *Ignicoccus*-Zelle durchaus denkbar. Die strukturellen Charakteristika der Porine sind in Bezug auf die Dimension der Pore (Durchmesser: 0,6 - 2 nm) ähnlich zu der 2 nm-Pore der 7 nm-Partikel. Mit Hilfe dieser wassergefüllten Porine sind Gram-negativer Bakterien in der Lage, kleine Moleküle oder Ionen bis hin zu einer Masse von 600 Da über die äußere Membran zu transportieren (Benz *et al.*, 1985; Böltner und Soll, 2001). Eine Funktion der 7 nm-Partikel als Polysulfid-Kanal in der äußeren Membran von *I. hospitalis* ist bei Betrachtung der Atommasse eines einfachen Polysulfid-Moleküls (H<sub>2</sub>S<sub>8</sub>) von etwa 250 Da somit rechnerisch möglich.

Nachdem *I. islandicus* und *I. pacificus* ebenfalls als chemolithoautotrophe Schwefelreduzierer beschrieben sind und einen ähnlichen ultrastrukturellen Aufbau wie *I. hospitalis* aufweisen, sind auch diese Spezies auf eine vergleichbaren Pore als Versorgungsstruktur für Polysulfide angewiesen. Im Rahmen früherer elektronenmikroskopischen Analysen konnten anhand von Gefrierätzpräparaten in den Zellhüllen beider Organismen zwar derartige Membrankomplexe nachgewiesen werden (Rachel *et al.*, 2002), eine Identifikation der am Aufbau dieser Strukturen beteiligten Proteinspezies steht jedoch noch aus.

### 3 Vergleiche der Struktur der Ihomp1-Komplexe mit klassischen Transmembranstrukturen

Wie bereits beschrieben, repräsentieren die 7 nm-Komplexe die dominierende Proteinstruktur der äußeren Membran von *I. hospitalis*. Obwohl für diese Membran durch elektronenmikroskopische Analysen ein asymmetrischer Aufbau bestimmt werden konnte (Rachel *et al.*, 2002), handelt es sich nicht um eine klassische äußere Membran, wie sie für Gram-negative Bakterien beschrieben ist, da sie in ihrer Lipid- und Protein Zusammensetzung deutlich von dieser abweicht (Jahn *et al.*, 2004; Näther und Rachel, 2004; Kandler und König, 1998).

Diese Sonderstellung drückt sich auch in den strukturellen Eigenschaften des Ihomp1-Monomers als strukturgebendem Protein der 7 nm-Partikel aus. So wurde bereits in früheren Arbeiten, entgegen dem Aufbau klassischer Proteinstrukturen der äußeren Membran Gram-negativer Bakterien, eine  $\alpha$ -helikale Sekundärstruktur für Ihomp1 vorhergesagt (Burghardt, 2005). Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnte diese Annahme sowohl bioinformatisch als auch experimentell bestätigt werden, wobei keine signifikanten Gemeinsamkeiten des Monomers mit bereits bekannten strukturell charakterisierten Proteinspezies nachgewiesen werden konnten (Kap. III. 2.6). Als Ergebnis dieser Studien ist von einer Lokalisation der  $\alpha$ -helikalen Transmembrandomäne im N-terminalen Sequenzbereich des prozessierten Proteins auszugehen. Ein signifikanter Anteil von  $\beta$ -Faltblattmotiven, welcher für die klassischen Porinstrukturen der äußeren Membran Gram-negativer Bakterien charakteristisch ist (Schulz, 1996; Schirmer, 1998; Koebnik *et al.*, 2000; Böltner und Soll, 2001; Nikaido, 2003), konnte auf diese Weise nicht nachgewiesen werden.

Wie bereits erwähnt, bildet Ihomp1 stabile homodecamere Komplexe aus, welche für die Bildung von Transmembranporen in der äußeren Membran verantwortlich sind und entsprechend der biophysikalischen Einzelkanalstudien möglicherweise eine physiologische Funktion in der Versorgung der Zelle mit dem terminalen Elektronenakzeptor Polysulfid einnehmen. Im Rahmen einer Oligomerisierungsstudie konnten für Ihomp1 neben den beschriebenen 45 und 50 kDa-Komplexen der 7 nm-Partikel auch Strukturen mit einer

apparenten Molekularmasse von 150 kDa nachgewiesen werden, welche vermutlich eine trimere Form der funktionellen Einheit der Ihomp1-Homodecamere darstellen.

Während derartige homotrimere Strukturen für die bereits erwähnten Porine der äußeren Membran Gram-negativer Bakterien charakteristisch sind (Schirmer, 1998; Koebnik *et al.*, 2000; Zeth *et al.*, 2000), zeigen die Ihomp1-Monomere in Bezug auf ihre rein  $\alpha$ -helikale Sekundärstruktur den typischen Aufbau klassischer transmembraner Cytoplasmamembrankomplexe. Somit stellen die Ihomp1-Homodecamere bezüglich ihrer Lokalisation und Struktur einen chimären Transmembrankomplex dar, welcher sowohl Porin-Eigenschaften als auch Eigenschaften von ATP-Synthasen, Aquaporinen und anderen porenbildenden Proteinen der Cytoplasmamembran aufweist.

In Bezug auf die Sekundärstrukturmerkmale, den Oligomerisierungsgrad und die Molekularmasse der Ihomp1-Monomere zeigen die homodecameren Ihomp1-Komplexe der 7 nm-Partikel auffällige Gemeinsamkeiten mit den bereits erwähnten membranständigen Ringstrukturen der **F<sub>1</sub>F<sub>0</sub>-ATP-Synthasen**, welche als Hauptenzymkomplexe der Energiegewinnung bzw. als Motor für den Ionentransport in der Cytoplasmamembran von Bakterien und eukaryotischen Organellen bakteriellen Ursprungs zu finden sind (Boyer, 1997). Verwandte Enzyme dieser bakteriellen ATP-Synthase konnten auch in Eukaryonten (V<sub>1</sub>V<sub>0</sub>-Typ) und Archaeen (A<sub>1</sub>A<sub>0</sub>-Typ) beschrieben werden (Müller und Grüber, 2003). Dabei stellt die archaeelle A<sub>1</sub>A<sub>0</sub>-ATP-Synthase funktionell betrachtet ein Homologes der genannten bakteriellen ATP-Synthase dar und weist zudem strukturelle Gemeinsamkeiten zu der Protonen-pumpenden V-Typ-ATPase der Eukaryoten auf (Hilario und Gogarten, 1998; Nishi und Forgac, 2002; Müller und Grüber, 2003; Lingl *et al.*, 2003; Murata *et al.*, 2005).

Mit Hilfe einer Genomanalyse konnten bereits acht Untereinheiten der ATP-Synthase von *I. hospitalis* im Genom eindeutig identifiziert werden (A, B, C, D, E, F, I und K), welche teilweise bereits massenspektrometrisch nachweisbar waren (unterstrichen). Darunter auch eine *V-type H<sup>+</sup>-transporting two-sector ATPase c subunit* (Igni\_0682), welche als Baustein der membranständigen Ringstruktur der A<sub>1</sub>A<sub>0</sub>-ATP-Synthase von *I. hospitalis* gilt und entsprechend der unterschiedlichen Nomenklatur eukaryontischer und archaeeller ATP-Synthasen nicht als "c", sondern als "K"-Untereinheit bezeichnet wird (Lolkema und Boekema, 2003; Kish-Trier *et al.*, 2008). Obwohl eine derartige Funktionalität für die Ihomp1-Komplexe ausgeschlossen werden kann, deuten die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit auf einige strukturelle Gemeinsamkeiten mit den Ringstrukturen der bakteriellen ATP-Synthasen hin. Ein Vergleich mit der archaeellen A<sub>1</sub>A<sub>0</sub>-Typ ATP-Synthase kann aufgrund des Fehlens stöchiometrisch korrekter Strukturdaten gegenwärtig nicht angestellt werden (Müller, 2004; Müller *et al.*, 2005; Kish-Trier *et al.*, 2008), sodass auf die Daten der in Bezug auf Masse und

Struktur ähnlichen (Müller *et al.*, 2005) c-Untereinheiten der homooligomeren Ringstrukturen der bakteriellen ATP-Synthase zurückgegriffen wurde.

So weisen die Ihomp1-Monomere der 7 nm-Partikel analog zu den c-Untereinheiten der bakteriellen ATP-Synthasen (ca. 8 kDa) eine geringe Molekularmasse von 6,23 kDa auf und durchspannen die Membran jeweils in  $\alpha$ -helikaler Form (Fillingame, 1992). Während die Monomere des bakteriellen c-Rings dabei in Form zweier Helices in der Membran verankert sind, besitzt das Ihomp1-Monomer für diesen Zweck lediglich eine  $\alpha$ -Helix. In Bezug auf die Stabilität der dabei gebildeten homooligomeren Strukturen gegenüber denaturierenden Bedingungen weisen sowohl der c-Ring als auch die Ihomp1-Komplexe besonders stabile Eigenschaften auf. So konnten analog zu den 45 und 50 kDa Ihomp1-Homodecameren, welche durch Aufkochen in Probenpuffer erst bei 110 °C in ihre Monomere dissoziieren (Burghardt *et al.*, 2007), auch SDS resistente Ringstrukturen für die  $F_1F_o$ -ATP-Synthasen von *Acetobacterium woodii* (Reidlänger und Müller, 1994), *Ilyobacter tartaricus* (Neumann *et al.* 1998) und *Propionigenium modestum* (Laubinger und Dimroth, 1988) beschrieben werden. Für die nichtkovalent verbundenen homooligomeren Ringstrukturen der  $F_1F_o$ -ATP-Synthasen konnten zudem artspezifische Stöchiometrien von 10 bis 14 Untereinheiten und Porendurchmesser von 2 bis 3 nm bestimmt werden (Ferguson, 2000; Fritz *et al.*, 2008). Diese Befunde decken sich mit den Ergebnissen der massenspektrometrischen LILBID-Analyse, welche für die 7 nm-Partikel der äußeren Membran von *I. hospitalis* eine ebenfalls auf nichtkovalenten Interaktionen beruhende Stöchiometrie von zehn Monomeren belegen (Kap. III. 2.7.1). Die tomographischen Rekonstruktionen früherer elektronenmikroskopischer Studien zeigten ebenfalls eine ähnlich dimensionierte Pore mit einem Innendurchmesser von 2 nm (Burghardt, 2005; Burghardt *et al.*, 2007).

Eine weitere helikale, ebenfalls in der Cytoplasmamembran lokalisierte Transmembranstruktur repräsentieren die **Aquaporin-Poren**, welche sowohl in Eukaryonten und Bakterien als auch in dem methanogenen Archaeum *Methanothermobacter marburgensis* experimentell nachgewiesen werden konnten (Agre *et al.*, 2002; Kozono *et al.*, 2003). Weitere mutmaßliche, archaeelle Aquaporine konnten durch bioinformatische Genomanalysen zudem in den Spezies *Archaeoglobus fulgidus* und *Methanosarcina barkeri* identifiziert werden (Kozono *et al.*, 2003). Es handelt sich um hochselektive Kanäle, welche in erster Linie für die Regulation des Wasserhaushaltes der Zelle verantwortlich sind (Preston *et al.*, 1992). Die Porenkomplexe zeigen dabei eine konservierte einheitliche Struktur, welche sich ähnlich zu den Ihomp1-Homodecameren und der Ringstruktur der  $F_1F_o$ -ATP-Synthasen, durch eine auffällig hohe Thermostabilität auszeichnen (Kozono *et al.*, 2003). Der strukturelle Aufbau dieser hochselektiven Kanäle, welche in erster Linie für die Regulation des Wasserhaushaltes der Zelle verantwortlich sind (Preston *et al.*, 1992), unterscheidet sich dabei

jedoch deutlich von den homodecameren Ihomp1-Komplexen. So weist das archaeelle Aquaporin-Monomer aus *Methanothermobacter marburgensis* (AqpM) mit 24 kDa eine deutlich höhere Molekularmasse auf als die Ihomp1-Monomere. Es durchspannt die Membran in Form von sechs Transmembrandomänen und bildet homotetramere Einheiten von vier Poren aus (Kozono *et al.*, 2003). Für die bioinformatische Erkennung derartiger Proteine wird eine konservierte funktionelle Region in der Aminosäuresequenz der Aquaporine genutzt. Diese wirkt als selektive Barriere der Pore gegenüber einem ungewollten Protonentransport und ist im zentralen Bereich der Pore lokalisiert. Es handelt sich um ein charakteristisches Sequenzmotiv aus drei Aminosäuren (Asparagin-Prolin-Alanin), welches als biologischer Fingerabdruck dieser Proteine betrachtet werden kann (de Groot und Grubmüller, 2001). Diese Protonenbarrierefunktion der Aquaporine ist für die Aufrechterhaltung des Protonengradienten über die Membran von grundlegender Bedeutung und auch für andere cytoplasmamembranständige Poren, wie beispielsweise Kalium- (Doyle *et al.*, 1998) oder Ammoniakkanäle (Khademi *et al.*, 2004), bekannt. Kalium- und Ammoniakkanäle stellen neben den Aquaporinen und den Ringstrukturen der ATP-Synthasen weitere weit verbreitete, rein  $\alpha$ -helikale Transmembranstrukturen dar. Im Falle der Kaliumkanäle handelt es sich um hochselektive wassergefüllte Kanäle, welche zwar eine extrem hohe Leitfähigkeit für Kaliumionen aufweisen, eine Co-Translokation von anderen Ionen wie Protonen oder Natriumionen jedoch nahezu vollständig unterbinden. Die Kanäle liegen als Homotetramer vor und bilden eine Art Trichter in der Cytoplasmamembran aus, dessen engste Stelle mit einem Durchmesser von lediglich 1 nm in Richtung des Cytoplasmas weist. Die Selektivität der Kanäle wird sowohl durch diese besondere Architektur als auch durch bestimmte Aminosäuremotive (Glycin-Tyrosin-Glycin) und Ladungsverteilungen in der Pore gewährleistet (Doyle *et al.*, 1998). Im Genom von *I. hospitalis* konnten bislang weder Aquaporine noch Kalium- oder Ammoniakkanäle identifiziert werden, aufgrund der strukturellen Unterschiede und des Fehlens charakteristischer Aminosäuremotive ist eine solche vergleichbar substratspezifische Funktion für die durch Ihomp1 gebildeten Poren eher unwahrscheinlich. Neben ihrer beschriebenen Funktion in der Regulation des Wasserhaushaltes der Zelle konnte für verschiedene Aquaporin-Poren auch eine physiologische Ionenleitfähigkeit nachgewiesen werden. So wurde für das eukaryotische Aquaporin AQP1 eine Funktion als cGMP-regulierter Kationenkanal bestimmt (Anthony *et al.*, 2000; Boassa *et al.*, 2006). Mit einem Wert von 160 pS weist AQP1 eine vergleichbar hohe Leitfähigkeit auf wie die homodecameren Ihomp1-Komplexe (120 pS).

Wie bereits erwähnt, zeigen die Ihomp1-Komplexe eine deutlich geringere Leitfähigkeit als die klassischen **Porin-Strukturen** der äußeren Membran Gram-negativer Bakterien, welche in einem Bereich von 0,5 bis 6 nS liegen. Mit dem Protein Omp32, einem Porin aus der

Spezies *Comamonas acidovorans*, konnte eine stark anionenselektive Pore beschrieben werden (Mathes und Engelhardt, 1998). Während die Eigenschaft einer Ionenselektivität für die Ihomp1-Pore bislang noch nicht untersucht werden konnte, weist dieses Porin mit einer salzkonzentrationsabhängigen Leitfähigkeit von 0,52 nS bei 1M KCl einen Wert auf, welcher dem Betrag der Ihomp1-Pore am nächsten kommt. Demgegenüber konnten für die Porine OmpF und LamB aus *E. coli* sowie dem Porin-Protein P aus *Pseudomonas aeruginosa*, in einer ebenfalls 1 M KCl-Elektrolytlösung, Werte von 1,9, 2,7 bzw. 5,7 nS ermittelt werden, wobei die jeweiligen Porendurchmesser ebenso uneinheitlich sind (1,2 nm, 1,4 nm bzw. 0,6 nm; Benz *et al.*, 1985). Diese Heterogenität der elektrophysiologischen Eigenschaften und der Porenstruktur drückt sich in einer hohen Diversität bezüglich des Aufbaus der Porine und ihrer physiologischen Funktionen in der äußeren Membran aus. So handelt es sich typischerweise um trimere Homooligomere, deren Sekundärstrukturmotiv zu über 90% das  $\beta$ -Faltblatt darstellt. Mit Hilfe dieser Porine sind die Zellen in der Lage kleine Moleküle oder Ionen bis hin zu einer Masse von 600 Da über die äußere Membran zu transportieren (Böltner und Soll, 2001). Durch diese in großer Zahl über die gesamte äußere Membran der Gram-negativen Bakterien verteilten Porinstrukturen wird der Membran der Charakter eines Molekularsiebes verliehen (Benz *et al.*, 1985). Die einzelnen Poren der Porine sind dabei je nach Typ aus 16, 18 oder 22 antiparallel zueinander ausgerichteten  $\beta$ -Faltblättern aufgebaut (Schirmer, 1998). Sie bilden im Vergleich zu den 7 nm-Partikeln der äußeren Membran von *I. hospitalis* ähnlich große Poren von 0,6 bis 2 nm im Durchmesser, welche wassergefüllt sind und je nach Porin-Typ in ihrer Funktion unspezifisch, spezifisch oder ligandenabhängig wirken können (Benz *et al.*, 1985; Schulz, 1996; Schirmer, 1998; Böltner und Soll, 2001; Nikaido, 2003).

Entgegen diesem klassischen Aufbau der genannten Porinstrukturen zeigt das ebenfalls in der äußeren Membran lokalisierte Protein **Wza<sub>K30</sub>** aus *E. coli* einen signifikanten Anteil an  $\alpha$ -helikalen Sekundärstrukturmotiven (Nesper *et al.*, 2003; Dong *et al.*, 2006). Dieses konservierte Lipoprotein gehört zur OMA- (Outer Membrane Auxiliary) Proteinfamilie und ist als Polysaccharid-Transporter über die äußere Membran in den Aufbau der Kapselstruktur auf der Oberfläche von *E. coli* eingebunden. Während es Homooctamere mit einer Masse von 340 kDa ausbildet, decken sich die Dimensionen und die Sekundärstruktur der Porenstruktur gut mit den homodecameren 45 und 50 kDa-Ihomp1-Komplexen der äußeren Membran von *I. hospitalis*. So konnte für das Wza<sub>K30</sub>-Protein mit dem  $\alpha$ -helical Barrel ein neuartiges Transmembranstrukturmodell beschrieben werden, welches einen Gesamtdurchmesser von etwa 9 nm und eine zentrale Pore von 2 nm in der äußeren Membran von *E. coli* ausbildet (Nesper *et al.*, 2003; Beis *et al.*, 2004; Dong *et al.*, 2006). Der wesentliche Anteil der Proteinstruktur ist im Periplasma lokalisiert und vermittelt eine Unidirektionalität der

---

Pore in Richtung des Extrazellulärraums. Während die elektrophysiologischen und bioinformatischen Analysen eine solche Geometrie und eingeschränkte Leitfähigkeit auch für die homodecameren Ihomp1-Komplexe andeuten, kann über die Richtung dieser Unidirektionalität der Ihomp1-Poren noch keine Aussage getroffen werden. Zwar konnten, wie bereits erwähnt, im Verlauf der vorläufigen Kristallisationsstudien erste beugende Proteinkristalle der porenenformenden Ihomp1-Komplexe gewonnen werden, welche jedoch aufgrund der bislang unzureichenden Beugungsdaten die Anforderungen an eine hochauflösende strukturelle Analyse noch nicht erfüllen. Für eine Bestimmung der Geometrie und Feinstruktur und damit der Funktion der Poren ist ein solcher experimenteller Ansatz jedoch unverzichtbar.

## V Zusammenfassung

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war die strukturelle und funktionelle Charakterisierung des dominierenden Oberflächenproteins von *I. hospitalis* sowie die Identifikation weiterer, potenziell am Aufbau der Kontaktstelle zwischen *I. hospitalis* und *N. equitans* beteiligter Proteinspezies.

Mit Ihomp1 (*Ignicoccus hospitalis outer membrane protein 1*) konnte das erste Protein einer bislang einzigartigen Membranstruktur in der Domäne der Archaeen charakterisiert werden. Es handelt sich entsprechend bioinformatischer Recherchen um ein kleines, funktionell uncharakterisiertes Protein (6,3 kDa), welches keine signifikanten strukturellen Homologien zu bekannten Proteinspezies aufweist. Wie im Rahmen der vorliegenden Arbeit gezeigt werden konnte, repräsentieren die durch Ihomp1 gebildeten homooligomeren 45 bzw. 50 kDa-Komplexe die funktionelle Einheit der dominierenden, Transmembranporen-formenden 7 nm-Partikel der Zelloberfläche von *I. hospitalis* und erfüllen möglicherweise eine Funktion in der Versorgung des Organismus mit Nährstoffen, wie dem terminalen Elektronenakzeptor Polysulfid. So konnte durch elektrophysiologische Einzelkanalstudien in künstlichen Systemen bereits eine signifikante Leitfähigkeit der Ihomp1-Komplexe nachgewiesen werden.

Immunzytologische Studien an Gefrierätzpräparaten der drei bekannten Spezies der Gattung *Ignicoccus* belegten, dass es sich bei Ihomp1 um ein spezies-spezifisch exprimierte Protein handelt. Vorläufige PCR-Analysen wiesen zudem auf ein ebenfalls auf *I. hospitalis* beschränktes Vorkommen des korrespondierenden Gens *igni\_1266* hin.

Für die strukturelle und funktionelle Charakterisierung der nativen Ihomp1-Komplexe wurde ein mehrstufiges Aufreinigungsprotokoll etabliert. Mit Hilfe umfangreicher massenspektrometrischer sowie bioinformatischer und CD-spektroskopischer Analysen konnte so für die beiden stabilen 45 und 50 kDa Ihomp1-Komplexe eine einheitliche Stöchiometrie aus zehn Monomeren bestimmt werden, welche die Membran in  $\alpha$ -helikaler Form durchspannen. Eine röntgenkristallographische Untersuchung der Komplexe ist in Bearbeitung. Entsprechend vorläufiger gelchromatographischer Daten wird zudem eine Funktion des Proteins in der Initiation der Zell-Zell-Interaktion zwischen *I. hospitalis* und *N. equitans* als spezifisches Erkennungs- bzw. Bindemotiv für das S-Layer-Protein NEQ300 aus *N. equitans* diskutiert.

Im Rahmen der proteinanalytischen Untersuchung der Membranfraktionen aus Rein- und Co-Kultur konnte die Expression von mehr als 280, in den Genomen von *I. hospitalis* und *N. equitans* annotierten Proteinspezies nachgewiesen werden. Die Interpretation der daraus gewonnenen Daten in Bezug auf eine mögliche Funktion dieser Proteine im Austausch zwischen *I. hospitalis* und *N. equitans* ist jedoch deutlich erschwert, da bioinformatischen Recherchen zufolge für einen Großteil der so identifizierten, mutmaßlichen Membranproteine der beiden Spezies gegenwärtig keine physiologische Funktion vorhergesagt werden kann.

## VI Anhang

### 1 Abkürzungsverzeichnis

Chemische Elementsymbole wurden gemäß der IUPAC-Richtlinien verwendet.

Å	Angström
AA	Acrylamid
ACN	Acetonitril
AOUH	Substitutionslösung für Gefriersubstitution: Aceton/Osmium/Uranylacetat/Wasser
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäure
BBR	Bakterienbank Regensburg
BCA	2,2'-Bichinolyl-4,4'-dicarbonsäure bzw. Bicinchoninsäure
BCIP	5-Bromo-4-Chloro-3-Indoyl-Phosphat
bp	Basenpaare
BPB	Bromphenolblau
BSA	<i>Bovine serum albumin</i>
CDS	<i>coding DNA sequence</i> ; Protein kodierende DNA-Sequenz
CTAB	Cetyltrimethylammoniumbromid
DDM	n-Dodecyl-beta-D-maltopyranosid
DTT	D,L-Dithiothreitol
ed.	Edition
ed(s).	Editor(en)
EDTA	Ethyldiamintetraessigsäure
EGFU	Substitutionslösung für Gefriersubst.: Ethanol/Glutaraldehyd/Formaldehyd/Uranylacetat
EGU	Substitutionslösung für Gefriersubstitution: Ethanol/Glutaraldehyd/Uranylacetat
ERG	Eppendorf-Reaktionsgefäß(e)
ESI	<i>Electron spray ionization</i>
ESI-MS	<i>Electron spray ionization</i> -Massenspektrometrie
e-value	<i>Expectation value</i>
FPLC	<i>Fast protein liquid chromatography</i>
GF	Gelfiltrations-Chromatographie
h	Stunde
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HP	<i>High performance</i> , bzgl. Matrixmaterial für Ionenaustauscher
HPLC	<i>High pressure liquid chromatography</i>
IEX	Ionenaustauscher-Chromatographie ( <i>Ion exchange chromatography</i> )
IEX-Anion	Anionenaustauscher
IEX-Kation	Kationenaustauscher
kb	Kilobasen

---

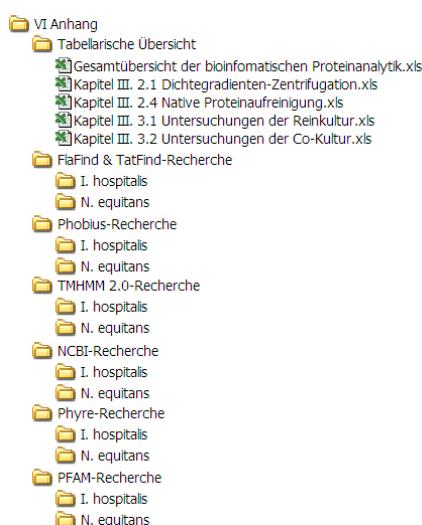
kDa	Kilo Dalton = 1000 g/mol
LC	Flüssigkeitschromatographie ( <i>liquid chromatography</i> )
ESI Nano-LC MS/MS	Flüssigkeitschromatographie mit anschließender Tandem-Massenspektrometrie
LILBID MS	<i>Liquid ion bead laser induced desorption mass spectrometry</i>
LPS	Lipopolsaccharid
MALDI-MS	<i>Matrix Assisted Laser Desorption/Ionisation mass spectrometry</i>
MES	2-(N-Morpholino-) Ethansulfonsäure
Min.	Minute
MM	Magermilch
mod.	modifiziert
MOPS	4-Morpholinopropansulfonsäure
MS	Massenspektrometrie
MS/MS	Tandem-Massenspektrometrie
MW	Molekulargewicht
mwco	<i>Molecular weight cut off</i> (Ausschlussgrenze in Filter- bzw. Konzentrationseinheiten)
NA	numerische Apertur
NBT	<i>nitro blue tetrazolium</i>
NRMSD	<i>normalized root mean square deviation</i>
OD	optische Dichte
p.a.	zur Analyse
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBG	<i>Phosphate buffered gelatin</i>
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i>
PCR	Polymerase-Kettenreaktion ( <i>polymerase chain reaction</i> )
pg	<i>Prep grade</i> (Matrixmaterial für die Gelfiltration)
pH	<i>pondus hydrogenii</i> (Wasserstoff-Exponent)
pl	isoelektrischer Punkt
PMF	<i>peptide mass fingerprinting</i> (MS-Messungen)
PMSF	Phenyl-methyl-sulfonyl-fluorid
PVDF	Polyvinylidendifluorid
Q	<i>Quaternary ammonium</i> Gruppe, Matrixmaterial Anionenaustauscher (-O-CH <sub>2</sub> -N <sup>+</sup> (CH <sub>3</sub> ) <sub>3</sub> )
rRNA	ribosomale Ribonukleinsäure
RP	<i>reversed phase</i>
RT	Raumtemperatur
S	Sedimentationskoeffizient
SDS	<i>Sodium dodecyl sulfate</i>
SDS-FRL	SDS digested freeze fracture replica labeling
Sek.	Sekunde
S-Layer	<i>Surface layer</i>
SME	synthetisches Meerwasser
sp.	Spezies
SP	Sulfopropyl-Gruppe, Matrixmaterial Kationenaustauscher

---

SV	Säulenvolumen
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TAT	<i>twin arginine translocation</i>
(T)EM	(Transmissions-) Elektronenmikroskop
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
TFA	Trifluoressigsäure
T max.	maximale Wachstumstemperatur
TOF	<i>Time of flight</i>
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
UPM	Umdrehungen pro Minute
UZ	Ultrazentrifugation bzw. Ultrazentrifuge
v/v bzw. w/v	Volumen pro Volumen bzw. Gewicht pro Volumen

## 2 Begleit-CD

Um den Zugriff auf die im Rahmen der bioinformatischen Proteinanalytik gewonnenen biophysikalischen und biochemischen Resultate sowie der Ergebnisse der Datenbankabgleiche mit den öffentlichen Datenbanken zu erleichtern, wurden die entsprechenden Ergebnisse nach verwendetem Vorhersagealgorithmus bzw. nach den verwendeten Datenbanken sortiert und auf einer Begleit-CD zusammengestellt. Eine tabellarische Übersicht aller im Rahmen dieser Arbeit identifizierten Proteine sowie eine an dem jeweiligen Kapitel/Experiment orientierte Tabelle ermöglicht eine schnelle Einsicht in die entsprechenden Daten. Zur besseren Orientierung ist in Abbildung 35 die Ordnerstruktur der Begleit-CD dargestellt. Die in den Dateinamen der jeweiligen Dateien enthaltenen Protein-IDs sind gemäß der NCBI-Proteindatenbank gewählt und entsprechen der aktuellen Nomenklatur.



**Abbildung 35: Ordnerstruktur der Begleit-CD.**

### 3 Tabellen

Tabelle 11: Auszug der Ergebnisse der Proteinidentifikation der in Abbildung 32 (Kap. III. 3.2.2) markierten Proteinbanden. Die Tabellen geben die Protein-IDs der aus den Gelbanden identifizierten Proteinspezies sortiert nach den untersuchten Peak-Fraktionen PI<sup>k</sup>, PI, PII, PIV und PV an. Gezeigt sind die besten acht Treffer der Mascot Datenbankrecherche in der NCBI-Proteindatenbank.

PI <sup>k</sup>	1	2	3	4	5	6	7	8
1a	NEQ300	Igni_0328	Igni0609	Igni1113	Igni0643	NEQ236	/	/
2a	Igni_1113	NEQ300	NEQ475	NEQ503	Igni_0243	Igni_0609	Igni_0129	/
3a	Igni_1113	Igni_0364	NEQ300	NEQ442	Igni_1431	Igni_0129	Igni_0609	NEQ475
4a	Igni_1431	Igni_1113	NEQ300	Igni_0628	NEQ252	NEQ442	Igni_0639	Igni_0364

PI	1	2	3	4	5	6	7	8
1	NEQ300	NEQ503	NEQ475	Igni_1113	Igni_0243	Igni_0609	NEQ236	Igni_0398
2	Igni_1113	NEQ300	NEQ475	Igni_0609	Igni_0129	NEQ236	/	/
3	Igni_1113	Igni_1431	NEQ300	Igni_0364	NEQ442	Igni_0609	Igni_0070	Igni_1215
4	Igni_1305	Igni_1113	NEQ300	NEQ141	Igni_1431	Igni_0256	Igni_1367	Igni_0364
5	NEQ141	Igni_1305	Igni_0096	NEQ103	Igni_0897	Igni_0609	Igni_1113	Igni_0542
6	Igni_0679	NEQ141	Igni_0542	Igni_1113	NEQ300	NEQ173	Igni_0897	NEQ103
7	Igni_1113	Igni_0132	NEQ263	Igni_1374	NEQ300	Igni_0070	NEQ236	NEQ035
8	Igni_0964	Igni_1182	Igni_0363	Igni_1001	Igni_1258	NEQ236	/	/
9	Igni_0747	NEQ433	Igni_1319	NEQ342	NEQ019	Igni_1140	Igni_0748	Igni_0100
10	NEQ091	NEQ170	NEQ059	NEQ141	Igni_0293	Igni_1113	NEQ368	Igni_0965
11	Igni_0965	Igni_1375	NEQ368	NEQ146	Igni_0460	NEQ098	Igni_1410	NEQ537
12	Igni_0590	Igni_0677	Igni_1159	Igni_1410	Igni_1208	NEQ300	Igni_0965	Igni_0058
13	NEQ361	NEQ478	Igni_1363	NEQ546	NEQ481	NEQ388	Igni_1417	NEQ242
14	Igni_1080	Igni_0365	NEQ241	Igni_1411	NEQ242	Igni_1181	/	/
15	Igni_1280	Igni_0353	NEQ311	Igni_1076	Igni_1256	NEQ207	NEQ101	NEQ187
16	Igni_0185	Igni_1275	Igni_1278	NEQ058	Igni_0180	NEQ487	Igni_0767	NEQ469

PII	1	2	3	4	5	6	7	8
1	NEQ300	Igni_1431	NEQ236	/	/	/	/	/
2	NEQ300	NEQ236	Igni_0639	Igni_1351	Igni_1431	Igni_0096	Igni_0256	/
3	NEQ300	/	/	/	/	/	/	/
4	NEQ300	Igni_1431	NEQ236	Igni_0256	Igni_0639	Igni_0609	Igni_0628	/
5	NEQ300	Igni_1431	Igni_0256	Igni_1305	NEQ236	Igni_1367	Igni_0609	Igni_0639
6	NEQ300	Igni_0096	Igni_0897	NEQ141	Igni_0609	NEQ103	NEQ236	Igni_1431
7	NEQ300	NEQ236	Igni_0542	Igni_0475	Igni_0595	Igni_0256	Igni_1228	Igni_0897
8	NEQ236	NEQ300	Igni_1374	Igni_0132	NEQ035	Igni_0475	/	/
9	NEQ300	NEQ236	Igni_1258	NEQ084	Igni_0363	Igni_1431	Igni_0673	NEQ436
10	NEQ300	NEQ236	Igni_1266	NEQ271	Igni_1387	NEQ342	Igni_0609	NEQ170
11	NEQ300	NEQ236	Igni_0293	Igni_1266	Igni_0524	NEQ368	Igni_0618	Igni_1214
12	Igni_1266	NEQ236	/	/	/	/	/	/
13	NEQ300	Igni_0590	NEQ444	NEQ236	Igni_1266	Igni_0533	Igni_0677	NEQ099
14	NEQ300	Igni_1080	NEQ236	NEQ481	Igni_0680	Igni_0363	Igni_0155	NEQ375
15	NEQ300	Igni_0984	NEQ236	Igni_0155	NEQ449	NEQ485	Igni_0980	Igni_1080
16	NEQ300	Igni_0767	NEQ058	NEQ184	Igni_0860	Igni_0632	NEQ236	NEQ485
17	Igni_1215	Igni_0174	Igni_0985	NEQ363	NEQ300	Igni_0027	NEQ548	Igni_0065

PIV	1	2	3	4	5	6	7	8
1	NEQ230	Igni_0955	Igni_1103	Igni_1399	NEQ239	/	/	/
2	NEQ239	NEQ230	Igni_1103	Igni_0955	NEQ300	Igni_1359	/	/
3	NEQ230	NEQ300	Igni_0955	NEQ239	Igni_1359	Igni_0476	/	/
4	Igni_0752	NEQ252	NEQ230	Igni_0955	NEQ177	Igni_1436	NEQ239	Igni_0476
5	NEQ177	Igni_1367	Igni_1359	Igni_0256	Igni_0162	Igni_1001	Igni_0126	NEQ468
6	Igni_0126	Igni_0162	Igni_0955	Igni_0276	NEQ177	NEQ349	Igni_1359	/
7	NEQ177	/	/	/	/	/	/	/
8	Igni_0040	NEQ468	Igni_1186	Igni_1416	Igni_0158	Igni_1220	Igni_0960	Igni_0955
9	Igni_0946	NEQ511	NEQ389	Igni_0944	Igni_0871	Igni_1102	Igni_1186	NEQ032
10	Igni_1436	NEQ458	Igni_1324	Igni_0454	Igni_1212	Igni_0955	Igni_0670	/
11	NEQ190	NEQ458	Igni_0454	Igni_0085	NEQ098	Igni_0057	Igni_0670	Igni_0040
12	NEQ098	NEQ458	NEQ537	Igni_0610	NEQ444	NEQ174	Igni_1103	Igni_0533
13	NEQ174	Igni_1219	NEQ444	Igni_0425	Igni_0047	Igni_0420	NEQ048	/
14	Igni_0047	NEQ174	NEQ444	/	/	/	/	/

## PV

1	NEQ543
2	Igni_0899

Tabelle 12: Ergebnisse der FlaFind- und TatFind-Recherche in den Genomen von *Ignicoccus hospitalis* und *Nanoarchaeum equitans*. Im Verlauf der Arbeit identifizierte Proteine sind durch Fettdruck hervorgehoben (siehe Kap. III. 3.2.4).

	[1]	[2]
Fla-Motiv	Igni_0200	hypothetical protein
Fla-Motiv	Igni_0228	hypothetical protein
Fla-Motiv	Igni_0371	hypothetical protein
Fla-Motiv	Igni_0455	hypothetical protein
Fla-Motiv	Igni_0472	ABC type tungstate transport system permease component like protein
Fla-Motiv	Igni_0501	hypothetical protein
Fla-Motiv	Igni_0520	hypothetical protein
Fla-Motiv	<b>Igni_0618</b>	hypothetical protein
Fla-Motiv	<b>Igni_0670</b>	hypothetical protein, putative flagellin (Meyer, 2007)
Fla-Motiv	Igni_1033	hypothetical protein
Fla-Motiv	Igni_1051	hypothetical protein
Fla-Motiv	Igni_1130	hypothetical protein
Fla-Motiv	Igni_1195	hypothetical protein
Fla-Motiv	Igni_1204	Periplasmic binding protein
Fla-Motiv	Igni_1341	Molybdenum ABC transporter, periplasmic molybdate binding protein
Tat-Motiv	Igni_0022	RNA-binding protein
Tat-Motiv	Igni_0172	4Fe-4S ferredoxin iron-sulfur binding domain-containing protein
Tat-Motiv	<b>Igni_1366</b>	Nickel-dependent hydrogenase small subunit
Tat-Motiv	Igni_1378	Putative nitrate reductase, subunit G
Fla-Motiv	NEQ134	hypothetical protein
Fla-Motiv	<b>NEQ137</b>	hypothetical protein
Fla-Motiv	NEQ376	hypothetical protein

## VII Literaturverzeichnis

- Agre P., King L. S., Yasui M., Guggino W. B., Ottersen O. P., Fujiyoshi Y., Engel A. und Nielsen S. (2002). Aquaporin water channels – from atomic structure to clinical medicine. *The Journal of Physiology*, 542 (1), 3-16.
- Albers S.-V., und Driessen A.J.M. (2002). Signal peptides of secreted proteins in the archaeon *Sulfolobus solfataricus*: a genomic survey. *Archives of Microbiology* 177, 209-216.
- Albers S.-V., Szabó Z. und Driessen A.J.M. (2003). Archaeal homolog of bacterial type IV prepilin signal peptidases with broad substrate specificity. *Journal of Bacteriology*, 185, 3918-3925.
- Albers S.-V., Szabó Z. und Driessen A. J. M. (2006). Protein secretion in the Archaea: multiple paths towards a unique cell surface. *Nature Reviews Microbiology*, 4, 537-547.
- Albers S.-V., Jonuscheit M., Dinkelaker S., Urich T., Kletzin A., Tampe' R., Driessen A. J. M. und Schleper C. (2006). Production of Recombinant and Tagged Proteins in the Hyperthermophilic Archaeon *Sulfolobus solfataricus*. *Applied and Environmental Microbiology*, 72 (1), 102-111.
- Allen G. (1989). Sequenzing of proteins and peptides. (Burdon R., Knippenberg P., eds.). Laboratory techniques in biochemistry and molecular biology. *Elsevier, Amsterdam, New York, Oxford*, 256-257.
- Anthony T. L., Brooks H. L., Boassa D., Leonov S., Yanochko G. M., Regan J. W. und Yool A. J. (2000). Cloned human aquaporin-1 is a cyclic GMP-gated ion channel. *Molecular Pharmacology*, 57, 576-588.
- Aravind L., Tatusov R. L., Wolf Y. I., Walker D. R. und Koonin E. V. (1998). Evidence for massive gene exchange between archaeal and bacterial hyperthermophiles. *Trends in Genetics*. 14, 442-444.
- Arnold T., Poynter M., Nussberger S., Lupas A. N. und Linke D. (2007). Gene Duplication of the Eight-stranded  $\beta$ -Barrel OmpX Produces a Functional Pore: A Scenario for the Evolution of Transmembrane  $\beta$ -Barrels. *Journal of Molecular Biology*, 366 (4), 1174-1184.
- Barns S. M., Fundyga R. E., Matthew W. J. und Pace N. R. (1994). Remarkable archaeal diversity detected in a Yellowstone National Park hot spring environment. *PNAS*, 91, 1609-1613.
- Baumeister W. und Hegerl R. (1996). Can S-layer make bacterial connections? *FEMS Microbiology Letters*, 36, 119-125.
- Beis K., Collins R.F., Ford R.C., Kamis A.B., Whitfield C. und Naismith J.H. (2004). Three-dimensional structure of Wza, the protein required for translocation of Group 1 capsular polysaccharide across the outer membrane of *Escherichia coli*. *Journal of Biological Chemistry*, 279, 28227-28232.
- Bennett-Lovsey R. M., Herbert A. D. Sternberg M. J. und Kelley L. A. (2008). Exploring the extremes of sequence/structure space with ensemble fold recognition in the program Phyre. *Proteins*, 70 (3), 611-25.
- Benz R., Janko K., Boos W. und Lauger P. (1978). Formation of large, ion-permeable membrane channels by the matrix protein (porin) of *Escherichia coli*. *Biochimica et Biophysica Acta*, 511 (3), 305-19.

- Benz R, Schmid A. und Hancock R. E. W. (1985). Ion Selectivity of Gram-Negative Bacterial Porins. *Journal of Bacteriology*, 162 (2), 722-727.
- Berks B.C., Sargent F. und Palmer T. (2000). The Tat protein export pathway. *Molecular Microbiology*, 35, 260-274.
- Blum H., Beier H. und Gross H. J. (1987). Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels. *Electrophoresis*, 8 (2), 93-99.
- Boassa D., Stamer W. D. und Yool A. J. (2006). Ion Channel Function of Aquaporin-1 Natively Expressed in Choroid Plexus. *The Journal of Neuroscience*, 26 (30), 7811-7819.
- Böhm G., Muhr R. und Jaenicke, R. (1992). Quantitative analysis of protein far UV circular dichroism spectra by neural networks. *Protein Engineering*, 5, 191-195.
- Böltner B. und Soll J. (2001). Ion channels in the outer membranes of chloroplasts and mitochondria: open doors or regulated gates? *EMBO Journal*, 20 (5), 935-940.
- Bouhss A., Crouvoisier M., Blanot D. und Mengin-Lecreux D. (2004). Purification and Characterization of the Bacterial MraY Translocase Catalyzing the First Membrane Step of Peptidoglycan Biosynthesis. *Journal of Biological Chemistry*, 279 (29), 29974-29980.
- Boucher I. W., McMillan P. J., Gabrielsen M., Akeman S. E., Brannigan J. A., Schnick C., Brzozowski A. M., Wilkinson A. J. und Müller S. (2006). Structural and biochemical characterization of a mitochondrial peroxiredoxin from *Plasmodium falciparum*. *Molecular Microbiology*, 61, 948-959.
- Boucher Y., Douady C. J., Papke R. T., Walsh D. A., Boudreau M. E. R., Nesbø C. L., Case R. J. und Doolittle W. F. (2003). Lateral Gene Transfer and the Origin of Prokaryotic Groups. *Annual Review of Genetics*, 37, 283-328.
- Boyer P. D. (1997). The ATP synthase – a splendid molecular machine. *Annual Review of Biochemistry*, 66, 717-749.
- Brochier C., Gribaldo S., Zivanovic Y., Confalonieri F. und Forterre, P. (2005). Nanoarchaea: representatives of a novel archaeal phylum or a fast evolving euryarchaeal lineage related to Thermococcales? *Genome Biology*, 6 (5), R42
- Brochier C., Boussau B., Gribaldo S. und Forterre P. (2008). Mesophilic crenarchaeota: proposal for a third archaeal phylum, the Thaumarchaeota. *Nature Reviews Microbiology*, 6, 245-252.
- Bruderer R. M., Brasseur C. und Meyer H. H. (2004). The AAA ATPase p97/VCP interacts with its alternative co-factors, Ufd1-Npl4 and p47, through a common bipartite binding mechanism. *Journal of Biological Chemistry*, 279, 49609-49616.
- Brüser T. und Sanders C. (2003). An alternative model of the twin-arginine translocation system, *Microbiological Research*, 158, 7-17.
- Bunai K. und Yamane K. (2005) Effectiveness and limitation of two-dimensional gel electrophoresis in bacterial membrane protein proteomics and perspectives. *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 815, 227-236.
- Burggraf S., Huber H. und Stetter K. O. (1997). Reclassification of the crenarchaeal orders and families in accordance with 16S rRNA sequence data. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 47, 657-660.
- Burghardt T. (2005). Isolation und Charakterisierung der Proteine der äußeren Membran von *Ignicoccus* sp. KIN41. *Diplomarbeit* am Lehrstuhl für Mikrobiologie der Universität Regensburg.

- Burghardt T., Nather D. J., Junglas B., Huber H. und Rachel R. (2007). The dominating outer membrane protein of the hyperthermophilic Archaeum *Ignicoccus hospitalis*: a novel pore-forming complex. *Molecular Microbiology*, 63 (1), 166-176.
- Burghardt T., Saller M., Gürster S., Müller D., Meyer C., Jahn U., Hochmut E., Deutzmann R., Babinger P., Wirth R., Huber H. und Rachel R. (2008). Insights into the proteome of the hyperthermophilic Crenarchaeum *Ignicoccus hospitalis*: the major cytosolic and membrane proteins. *Archives of Microbiology*, 190, 379-394.
- Cao B., Porollo A., Adamczak R., Jarrell M. und Meller J. (2006). Enhanced recognition of protein transmembrane domains with prediction-based structural profiles. *Bioinformatics*, 22 (3), 303-309.
- Casanueva A., Galada N., Baker G. C., Grant W. D., Heaphy S., Jones B., Yanhe M., Ventosa A., Blamey J. und Cowan D. A. (2008). Nanoarchaeal 16S rRNA gene sequences are widely dispersed in hyperthermophilic and mesophilic halophilic environments. *Extremophiles*, 12(5), 651-656.
- Cheng J. und Baldi P. (2005). Three-stage prediction of protein beta-sheets by neural networks, alignments and graph algorithms. *Bioinformatics*, 21 (Suppl 1), i75-i84.
- Ciccarelli F. D., Doerks T., von Mering C., Creevey C. J., Snel B. und Bork P. (2006). Toward automatic reconstruction of a highly resolved tree of life. *Science*, 311, 1283-1287.
- Coles M., Diercks T., Liermann J., Gröger A., Rockel B., Baumeister W., Koretke K. K., Lupas A. N., Peters J. und Kessler H. (1999). The solution structure of VAT-N reveals a 'missing link' in the evolution of complex enzymes from a simple beta element. *Current Biology*, 9 (20), 1158-1168.
- Cowan, D. A., Smolenski, K. A., Daniel, R. M. und Morgan, H. W. (1987). An extremely thermostable extracellular proteinase from a strain of the archaebacterium *Desulfurococcus* growing at 88 °C. *Biochemical Journal*, 247, 121-133.
- Declan A. Doyle D. A., Cabral J. M., Pfuetzner R. A., Kuo A., Gulbis J. M., Cohen S. L., Chait B. T. und MacKinnon R. (1998). The Structure of the Potassium Channel: Molecular Basis of K<sup>+</sup> Conduction and Selectivity. *Science*, 280, 69-77.
- de Groot B. L. und Grubmuller H. (2001). Water permeation across biological membranes: mechanism and dynamics of aquaporin-1 and GlpF. *Science*, 294, 2353-2357.
- De Rosa M. und Gambacorta A. (1986). Lipid biogenesis in archaebacteria. In *Archaeabacteria '85*. Kandler O. und Zillig W. (eds). Stuttgart: Fischer, pp. 278-285.
- Dong C., Beis K., Nesper J., Brunkan-Lamontagne A.L., Clarke B.R., Whitfield C. und Naismith J.H.. 2006). Wza the translocon for *E. coli* capsular polysaccharides defines a new class of membrane protein. *Nature*, 444, 226-229.
- Dreveny I., Kondo H., Uchiyama K., Shaw A., Zhang X. und Freemont P. S. (2004). Structural basis of the interaction between the AAA ATPase p97/VCP and its adaptor protein p47. *The EMBO Journal*, 23, 1030-1039.
- Dubey A. K., Baker C. S., Suzuki K., Jones A. D., Pandit P., Romeo T. und Babitzke P. (2003). CsrA Regulates Translation of the *Escherichia coli* Carbon Starvation Gene, cstA, by Blocking Ribosome Access to the cstA Transcript. *Journal of Bacteriology*, 185 (15), 4450-4460.
- Ducret A., Van Oostveen I., Eng J.K., Yates J.R. und Aebersold R. (1998). High throughput protein characterization by automated reverse-phase chromatography electrospray tandem mass spectrometry. *Protein Science*, 7, 706-719.
- Edman P. (1950). Method for the determination of amino acid sequence in peptides. *Acta Chemica Scandinavica*, 4, 283-293.

- Elferink M. G. L., Albers S.-V., Konings W. N. und Driessen A. J. M. (2001). Sugar transport in *Sulfolobus solfataricus* is mediated by two families of binding protein-dependent ABC transporters. *Molecular Microbiology*, 39, 1494-1503.
- Engelhardt H. und Peters J. (1998). Structural research on surface layers: A focus on stability, surface layer homology domains, and surface layer-cell wall interaction. *Journal of Structural Biology*, 124, 276-302.
- Engelhardt H. (2007a). Are S-layers exoskeletons? The basic function of protein surface layers revisited. *Journal of Structural Biology*, 160, 115-124.
- Engelhardt H. (2007b). Mechanism of osmoprotection by archaeal S-layers: A theoretical study. *Journal of Structural Biology*, 160, 190-199.
- Evguenieva-Hackenberg E., Walter P., Hochleitner E., Lottspeich F. und Klug G. (2003). An exosome-like complex in *Sulfolobus solfataricus*. *EMBO Reports*, 4 (9), 889-893.
- Fariselli P., Finelli M., Marchignoli D., Martelli P. L., Rossi I. und Casadio R. (2003). MaxSubSeq: an algorithm for segment-length optimization. The case study of the transmembrane spanning segments. *Bioinformatics*, 19 (4), 500-505.
- Fenn J. B., Mann M., Meng C. K., Wong S. F. und Whitehouse C. M. (1989). Electrospray ionization for mass spectrometry of large biomolecules. *Science*, 246 (4926), 64-71.
- Ferguson S.J. (2000). ATP synthase: What dictates the size of a ring? *Current Biology*, 10, R804-R808.
- Fillingame R. H. (1992). Subunit-c of  $F_1F_0$  ATP synthase – structure and role in transmembrane energy transduction. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1101, 240-243.
- Finn R. D., Mistry J., Schuster-Boeckler B., Griffiths-Jones S., Hollich V., Lassmann T., Moxon S., Marshall M., Khanna A., Durbin R., Eddy S. R., Sonnhammer E. L. L. und Bateman A. (2006). Pfam: clans, web tools and services. *Nucleic Acids Research*, 34 (Suppl 1), D247-D251.
- Fontecave M., de Choudens S. O., Py B. und Barras F. (2005). Mechanisms of iron–sulfur cluster assembly: the SUF machinery. *Journal of Biological Inorganic Chemistry*, 10, 713-721.
- Fricke H., Giere O., Stetter K. O., Alfredsson G. A., Kristjansson J. K., Stoffers P. und Svaravsson J. (1989). Hydrothermal vent communities at the shallow subpolar Mid-Atlantic ridge. *Marine Biology*, 102, 425-429.
- Fritz M., Klyszejko A. L., Morgner N., Vonck J., Brutschy B., Muller D. J., Meier T. und Müller V. (2008). An intermediate step in the evolution of ATPases-a hybrid  $F_0$ - $V_0$  rotor in a bacterial  $Na^+$   $F_1F_0$  ATP synthase. *FEBS Journal*, 275, 1999-2007.
- Fujimoto K. (1995). Freeze-fracture replica electron microscopy combined with SDS digestion for cytochemical labeling of integral membrane proteins. Application to the immunogold labeling of intercellular junctional complexes. *Journal of Cell Science*, 108 (11), 3443-3449.
- Gallenberger M. (2008). Biochemische Untersuchungen zum Kohlenstoffmetabolismus im Organismensystem *Ignicoccus hospitalis* und *Nanoarchaeum equitans*. *Diplomarbeit* am Lehrstuhl für Mikrobiologie der Universität Regensburg.
- Garrow A. G., Agnew A. und Westhead D. R. (2005). TMB-Hunt: a web server to screen sequence sets for transmembrane beta-barrel proteins. *Nucleic Acids Research*, 33 (Suppl 2), W188-192.
- Gasteiger E., Hoogland C., Gattiker A., Duvaud S., Wilkins M.R., Appel R.D. und Bairoch A. (2005). Protein Identification and Analysis Tools on the ExPASy Server, (In) John M. Walker (ed): The Proteomics Protocols Handbook, Humana Press 571-607.

- Gerega A., Rockel B., Peters J., Tamura T., Baumeister W. und Zwickl P. (2005). VAT, the Thermoplasma Homolog of Mammalian p97/VCP, Is an N Domain-regulated Protein Unfoldase. *Journal of Biological Chemistry*, 280 (52), 42856-42862.
- Graham L. L., Beveridge T. J. und Nanninga N. (1991). Periplasmic space and concept of periplasm. *Trends in Biochemical Sciences*, 16 (9), 328-329.
- Golbik R., Lupas A. N., Koretke K. K., Baumeister W. und Peters J. (1999). The Janus Face of the Archaeal Cdc48/p97 Homologue VAT: Protein Folding versus Unfolding. *Journal of Biological Chemistry*, 380, 1049-1062.
- Gürster S. (2007). Versuche zur Reindarstellung und strukturellen und proteinbiochemischen Charakterisierung des Archaeums *Nanoarchaeum equitans*. *Diplomarbeit* am Lehrstuhl für Mikrobiologie der Universität Regensburg.
- Halawani D. und Latterich M. (2006). p97: The Cell's Molecular Purgatory? *Molecular Cell*, 22 (6), 713-717.
- Hall J. E. und R. Latorre R. (1976). Nonactin-K<sup>+</sup> complex as a probe for membrane asymmetry. *Biophysical Journal*, 15, 99-103.
- Hanson P. I., Roth R., Morisaki H., Jahn R. und Heuser J. E. (1997). Structure and conformational changes in NSF and its membrane receptor complex visualized by quick-freeze/deep-etch electron microscopy. *Cell*, 90, 523-535.
- Hedderich R., Klimmek O., Kröger A., Dirmeyer R., Keller M. und Stetter K.O. (1999). Anaerobic respiration with elemental sulfur and with disulfides. *FEMS Microbiology Reviews*, 22, 353-381.
- Hilario E. und Gogarten J. P. (1998). The prokaryote-to-eukaryote transition reflected in the evolution of the V/F/A-ATPase catalytic and proteolipid subunits. *Journal of Molecular Evolution*, 46, 703-715.
- Hirokawa T. (1998). SOSUI: classification and secondary structure prediction system for membrane proteins. *Bioinformatics*, 14 (4), 378-379.
- Hoffmeister M. und Martin W. (2003). Interspecific evolution: microbial symbiosis, endosymbiosis and gene transfer. *Environmental Microbiology*, 5 (8), 641-649.
- Hohn M. J., Hedlund B. P., und Huber H. (2002). Detection of 16S rRNA sequences representing the novel phylum "Nanoarchaeota": Indication for a world wide distribution in high temperature biotopes. *Systematic and Applied Microbiology*, 25, 551-554.
- Hollenstein K., Frei D. C. und Locher K. P. (2007). Structure of an ABC transporter in complex with its binding protein. *Nature*, 446, 213-216.
- Huber H., Burggraf S., Mayer T., Wyschkony 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. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 50 (6), 2093-2100.
- Huber H., Hohn M. J., Rachel R., Fuchs T., Wimmer V. C. und Stetter K. O. (2002). A new phylum of Archaea represented by a nanosized hyperthermophilic symbiont. *Nature*, 417, 63-67.
- Huber H., Hohn M. J., Stetter K. O. und Rachel R. (2003). The phylum Nanoarchaeota: Present knowledge and future perspectives of a unique form of life. *Research in Microbiology*, 154 (3), 165-171.

- Huber H., Gallenberger M., Jahn U., Eylert E., Berg I. A., Kockelkorn D., Eisenreich W. und Fuchs G. (2008). A dicarboxylate/4-hydroxybutyrate autotrophic carbon assimilation cycle in the hyperthermophilic Archaeum *Ignicoccus hospitalis*. *PNAS*, 105 (22), 7851-7856.
- Hügler M., Huber H., Stetter K. O. und Fuchs G. (2003). Autotrophic CO<sub>2</sub> fixation pathways in archaea (Crenarchaeota). *Archives of Microbiology*, 179, 160-173.
- Hunte C., von Jagow G. und Schägger H. (2003). Membrane Protein Purification and Crystallization. A Practical Guide, 2nd edn. San Diego, CA: Academic Press.
- Ishihama Y. (2005). Proteomic LC-MS systems using nanoscale liquid chromatography with tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1067, 73-83.
- 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.
- Jahn U., Summons R., Sturt H., Grosjean E. und Huber H. (2004). Composition of the lipids of *Nanoarchaeum equitans* and their origin from its host *Ignicoccus* sp. strain KIN4/I. *Archives of Microbiology*, 182 (5), 404-413.
- Jahn U., Huber H., Eisenreich W., Hügler M. und Fuchs G. (2007). Insights into the Autotrophic CO<sub>2</sub> Fixation Pathway of the Archaeon *Ignicoccus hospitalis*: Comprehensive Analysis of the Central Carbon Metabolism? *Journal of Bacteriology*, 189 (11), 4108-4119.
- Jahn U., Gallenberger M., Paper W., Junglas B., Eisenreich W., Stetter K. O., Rachel R. und Huber H. (2008). *Nanoarchaeum equitans* and *Ignicoccus hospitalis*: New Insights into a Unique, Intimate Association of Two Archaea. *Journal of Bacteriology*, 190 (5), 1743-1750.
- Jap B. K., Walian P. J. und Gehring K. (1991). Structural architecture of an outer membrane channel as determined by electron crystallography. *Nature*, 350, 167-170.
- Johnson W. C. Jr. (1990). Protein secondary structure and circular dichroism: a practical guide. *Proteins: Structure, Function and Genetics*, 7, 205-214.
- Junglas B. (2006). Die hyperthermophilen Archaeen *Ignicoccus* sp. KIN4/M und *Nanoarchaeum equitans*: Ultrastrukturelle und Immuncytochemische Untersuchungen an Ultradünnsschnitten. *Diplomarbeit* am Lehrstuhl für Mikrobiologie der Universität Regensburg.
- Junglas B., Briegel A., Burghardt T., Walter P., Huber H. und Rachel R. (2008). *Ignicoccus hospitalis* and *Nanoarchaeum equitans*: Ultrastructure, cell-cell interaction, and 3D reconstruction from serial sections of freeze-substituted cells and by electron cryotomography. *Archives of Microbiology*, 190, 395-408.
- Käll L., Krogh A. und Sonnhammer E. L. L. (2004). A Combined Transmembrane Topology and Signal Peptide Prediction Method. *Journal of Molecular Biology*, 338 (5), 1027-1036.
- Kandler O. und König H. (1998). Cell wall polymers in archaea (archaeabacteria). *Cellular and Molecular Life Science*, 54, 305-308.
- Karas M., Bachmann D., Bahr U. und Hillenkamp F. (1987). Matrix-assisted ultraviolet laser desorption of non-volatile compounds. *International Journal of Mass Spectrometry and Ion Processes*, 78, 53-68.
- Karas M. und Hillenkamp F. (1988). Laser desorption ionization of proteins with molecular masses exceeding 10,000 daltons. *Analytical Chemistry*, 60 (20), 2299-2301.
- Karlin S., Mrázek J., Ma J., und Brocchieri L. (2005). Predicted highly expressed genes in archaeal genomes. *PNAS*, 102, 7303-7308.

- Kates M. (1986). Techniques of lipidology: isolation, analysis and identification of lipids. In: Bubon, R. H., and van Knippenberg, P. H. (Eds); *Laboratory techniques in biochemistry and molecular biology*. Elsevier Science Publishers, Amsterdam, Netherlands.
- Khademi S., O'Connell J., Remis J., Robles-Colmenares Y., Miercke L. J. W. und Stroud R. M. (2004). Mechanism of ammonia transport by Amt/MEP/Rh: structure of AmtB at 1.35 Å°. *Science*, 305, 1587-1594.
- Kish-Trier E., Briere L. K., Dunn S. D. und Wilkens S. (2008). The Stator Complex of the A<sub>1</sub>A<sub>0</sub>-ATP Synthase - Structural Characterization of the E and H Subunits. *Journal of Molecular Biology*, 375 (3), 673-685.
- Klein C., Garcia-Rizo C., Bisle B., Scheffer B., Zischka H., Pfeiffer F., Siedler F., und Oesterhelt D. (2005). The membrane proteome of *Halobacterium salinarum*. *Proteomics*, 5 (1), 180-197.
- Kleinekofort W., Avdiev J. und Brutschy B. (1996). A new method of laser desorption mass spectrometry for the study of biological macromolecules. *International Journal of Mass Spectrometry and Ion Processes*, 152 (2-3), 135-142.
- Klimmek O., Kreis V., Klein C., Simon J., Wittershagen A. und Kröger A. (1998). The function of the periplasmic Sud protein in polysulfide respiration of *Wolinella succinogenes*. *European Journal of Biochemistry*, 253, 263-269.
- Koebnik R., Locher K.P. und van Gelder P. (2000). Structure and function of bacterial outer membrane proteins: barrels in a nutshell. *Molecular Microbiology*, 37, 239-253.
- Kolker E., Higdon R. und Hogan J.M. (2006). Protein identification and expression analysis using mass spectrometry. *Trends in Microbiology*, 14, 229-235.
- König H. (1988). Archaeabacterial cell envelopes. *Canadian Journal of Microbiology*, (1988), 34, 395-406.
- Koradi R., Billeter M., Wüthrich K. (1996). MOLMOL: A program for display and analysis of macromolecular structures. *Journal of Molecular Graphics*, 14, 51-55
- Kozono D., Ding X., Iwasaki I., Meng X., Kamagata Y., Agre P. und Kitagawa Y. (2003). Functional Expression and Characterization of an Archaeal Aquaporin. *Journal of Biological Chemistry*, 278 (12), 10649–10656.
- Krogh A., Larsson B., von Heijne G. und Sonnhammer E. L. L. (2001). Predicting transmembrane protein topology with a hidden markov model: application to complete genomes. *Journal of Molecular Biology*, 305 (3), 567-580.
- Laemmli U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227, 680-685.
- Lange B. M. Rujan T. Martin W. und Croteau R. (2000). Isoprenoid biosynthesis: the evolution of two ancient and distinct pathways across genomes. *PNAS*, 97, 13172-13177.
- Latterich M., Fröhlich K.U. und Schekman R. (1995). Membrane fusion and the cell cycle: Cdc48p participates in the fusion of ER membranes. *Cell*, 82, 885-893.
- Laubinger W. und Dimroth P. (1989). The sodium translocating adenosintriphosphatase of *Propionigenium modestum* pumps protons at low sodium ion concentrations. *Biochemistry*, 28, 7194-7198.
- Lewalter K. und Müller V. (2006). Bioenergetics of archaea: Ancient energy conserving mechanisms developed in the early history of life. *Biochimica et Biophysica Acta – Bioenergetics*, 1757 (5-6), 437-445.

- Limauro D., Pedone E., Pirone L. und Bartolucci S. (2006). Identification and characterization of 1-Cys peroxiredoxin from *Sulfolobus solfataricus* and its involvement in the response to oxidative stress. *FEBS Journal*, 273, 721-731.
- Lingl A., Huber H., Stetter K. O., Mayer F., Kellermann J. und Müller V. (2003). Isolation of a complete A<sub>1</sub>A<sub>0</sub> ATP synthase comprising nine subunits from the hyperthermophile *Methanococcus jannaschii*. *Extremophiles*, 7, 249–257.
- Lolkema J. S. und Boekema E. J. (2003). The A-type ATP synthase subunit K of *Methanopyrus kandleri* is deduced from its sequence to form a monomeric rotor comprising 13 hairpin domains. *FEBS Letters*, 543, 47-50.
- Lupas A. N. und Martin J. (2002). AAA proteins. *Current Opinion in Structural Biology*, 12 (6), 746-753.
- Mao D., Wachter E. und Wallace B. A. (1982). Folding of the mitochondrial proton adenosinetriphosphatase proteolipid channel in phospholipid vesicles. *Biochemistry*, 21, 4960-4968.
- Markowitz V. M., Szeto E., Palaniappan K., Grechkin Y., Chu K., Chen I. A., Dubchak I., Anderson I., Lykidis A., Mavromatis K., Ivanova N. N. und Kyrpides N. C. (2008). The integrated microbial genomes (IMG) system in 2007: data content and analysis tool extensions. *Nucleic Acids Research*, 36, D528-D533.
- Mathes A. und Engelhardt H. (1998). Nonlinear and Asymmetric Open Channel Characteristics of an Ion-Selective Porin in Planar Membranes. *Biophysical Journal*, 75, 1255-1262.
- McCliment E. A., Voglsonger K. M., O'Day P. A., Dunn E. E., Holloway J. R. und Cary, S. C. (2006). Colonization of nascent, deep-sea hydrothermal vents by a novel Archaeal and Nanoarchaeal assemblage. *Environmental Microbiology*, 8, 114-125.
- Meier T., Polzer P., Diederichs K., Welte W. und Dimroth P. (2005). Structure of the rotor ring of F-type Na<sup>+</sup>-ATPase from *Illyobacter tartaricus*. *Science*, 308, 659-662.
- Meyer C. (2007). Charakterisierung von Zellanhängen und extrazellulären Strukturen bei *Ignicoccus pacificus*. *Diplomarbeit* am Lehrstuhl für Mikrobiologie der Universität Regensburg.
- Mitome N., Suzuki T., Hayashi S. und Yoshida M. (2004). Thermophilic ATP synthase has a decamer c-ring: indication of noninteger 10:3 H<sup>+</sup>/ATP ratio and permissive elastic coupling. *PNAS*, 101, 12159-12164.
- Morgner N., Barth H. und Brutschy B. (2006). A New Way To Detect Noncovalently Bonded Complexes of Biomolecules from Liquid Micro-Droplets by Laser Mass Spectrometry. *Australian Journal of Chemistry*, 59 (2), 109-114.
- Morgner N., Kleinschroth T., Barth H. D., Ludwig B. und Brutschy B. (2007). A Novel Approach to Analyze Membrane Proteins by Laser Mass Spectrometry: From Protein Subunits to the Integral Complex. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, 18 (8), 1429-1438.
- Müller D. (2005). Charakterisierung der Zellanhänge von *Ignicoccus* sp. *Diplomarbeit*, Lehrstuhl für Mikrobiologie der Universität Regensburg
- Müller V. und Grüber G. (2003). ATP synthases: structure, function and evolution of unique energy converters. *Cellular and Molecular Life Science*, 60, 474-494.
- Müller V. (2004). An exceptional variability in the motor of archaeal A<sub>1</sub>A<sub>0</sub> ATPases: from multimeric to monomeric rotors comprising 6–13 ion binding sites. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*, 36, 115-125.

- Müller V., Lingl A., Lewalter K. und Fritz M. (2005). ATP Synthases With Novel Rotor Subunits: New Insights into Structure, Function and Evolution of ATPases. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*, 37 (6), 455-460.
- Mullis K. B. und Faloona F. A. (1987). Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods in Enzymology*, 155, 335-50.
- Murakami S., Nakashima R., Yamashita E. und Yamaguchi A. (2002). Crystal structure of bacterial multidrug efflux transporter AcrB. *Nature*, 419, 588-593.
- Murata T., Yamato I., Kakinuma Y., Leslie A. G. W. und Walker J. E. (2005). Structure of the Rotor of the V-Type Na-ATPase from *Enterococcus hirae*. *Science*, 308, 654-659.
- Muscholl A., Galli D., Wanner G. und Wirth R. (1993). Sex pheromone plasmid pAD1-encoded aggregation substance of *Enterococcus faecalis* is positively regulated in trans by traE1. *European Journal of Biochemistry*, 214 (1), 333-338.
- Nachin L., Loiseau L., Expert D. und Barras F. (2003). SufC: an unorthodox cytoplasmic ABC/ATPase required for [Fe S] biogenesis under oxidative stress. *The EMBO Journal*, 22, 427-437.
- Nagakubo S., Nishino K., Hirata T. und Yamaguchi A. (2002). The Putative Response Regulator BaeR Stimulates Multidrug Resistance of *Escherichia coli* via a Novel Multidrug Exporter System, MdtABC. *Journal of Bacteriology*, 184 (15), 4161-4167.
- Näther D. J. und Rachel R. (2004). The outer membrane of the hyperthermophilic archaeon *Ignicoccus*: dynamics, ultrastructure and composition. *Biochemical Society Transactions*, 32 (2), 199-203.
- Nelson K. E., Clayton R. A., Gill S. R. und Gwinn M. L. (und 25 weitere Coautoren). (1999). Evidence for lateral gene transfer between Archaea and Bacteria from genome sequence of *Thermotoga maritima*. *Nature*, 399, 323-329.
- Nesper J., Hill C.M.D., Paiment A., Harauz G., Beis K., Naismith J.H. und Whitfield C.. (2003). Translocation of group 1 capsular polysaccharide in *Escherichia coli* serotype K30. Structure and functional analysis of the outer membrane lipoprotein Wza. *Journal of Biological Chemistry*, 278, 49763-49772.
- Neumann S., Matthey U., Kaim G. und Dimroth P. (1998). Purification and Properties of the F<sub>1</sub>F<sub>0</sub> ATPase of *Illyobacter tartaricus*, a Sodium Ion Pump. *Journal of Bacteriology*, 180 (13), 3312-3316.
- Nikaido H. (2003). Molecular basis of bacterial outer membrane permeability revisited. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 67, 593-656.
- Nishi T. und Forgac M. (2002). The vacuolar (H<sup>+</sup>)-ATPases - nature's most versatile proton pumps. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 3, 94-103.
- Ochman H. und Moran, N. A. (2001). Genes lost and genes found: Evolution of bacterial pathogenesis and symbiosis. *Science*, 292, 1096-1098.
- Papayannopoulos I.A. (1995). The Interpretation of Collision-Induced Dissociation Tandem Mass-Spectra of Peptides. *Mass Spectrometry Reviews*, 14, 49-73.
- Paper W. (2005). Wachstumsuntersuchungen und physiologische Charakterisierungen des Organismensystems *Nanoarchaeum equitans* und *Ignicoccus* sowie der Anreicherungskultur CU1. *Diplomarbeit am Lehrstuhl für Mikrobiologie der Universität Regensburg*.
- Paper W., Jahn U., Hohn M.J., Kronner M., Näther D.J., Burghardt T., Rachel R., Stetter K.O. und Huber H. (2007). *Ignicoccus hospitalis* sp. nov., the host of 'Nanoarchaeum equitans'. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 57, 803-808.

- Perkins D. N., Pappin ,D. J. C., Creasy D. M. und Cottrell J. S. (1999). Probability-based protein identification by searching sequence databases using mass spectrometry data. *Electrophoresis*, 20, 3551-3567.
- Phipps B. M., Huber R. und Baumeister W. (1991). The cell envelope of the hyperthermophilic archaebacterium *Pyrobaculum organotrophum* consists of two regularly arrayed protein layers: three-dimensional structure of the outer layer. *Molecular Microbiology*, 5, 523-528.
- Pley U., Schipka J., Gambacorta A., Jannasch H. W., Fricke H., Rachel R. und Setter K. O. (1991). *Pyrodictium abyssi* sp. nov. represents a novel heterotrophic marine archaeal hyperthermophile growing at 110°C. *Systematic and Applied Microbiology*, 14 (3), 245-253.
- Pohlschröder M., Hartmann E., Hand N. J., Dilks K. und Haddad A. (2005). Diversity and evolution of protein translocation. *Annual Reviews of Microbiology*, 59, 91-111.
- Preston G. M., Carroll T. P., Guggino W. B. und Agre P. (1992). Appearance of Water Channels in Xenopus Oocytes Expressing Red Cell CHIP28 Protein. *Science*, 256, 385-387.
- Rabouille, C., Levine, T.P., Peters, J.M. und Warren, G. (1995). An NSF-like ATPase, p97, and NSF mediate cisternal regrowth from mitotic Golgi fragments. *Cell*, 82, 905-914.
- Rachel R., Wyschkony I., Riehl S. und Huber H. (2002). The ultrastructure of *Ignicoccus*: evidence for a novel outer membrane and for intracellular vesicle budding in an archaeon. *Archaea*, 1, 9-18.
- Reidlinger J. und Müller V. (1994). Purification of ATP synthase from *Acetobacterium woodii* and identification as a  $\text{Na}^+$ -translocating  $\text{F}_1\text{F}_0$ -type enzyme. *European Journal of Biochemistry*, 223, 275-283.
- Reizer J., Reizer A. und Saier M.H. (1990). The  $\text{Na}^+$ /pantothenate symporter (PanF) of *Escherichia coli* is homologous to the  $\text{Na}^+$ / proline symporter (PutP) of *E. coli* and the  $\text{Na}^+$ /glucose symporters of mammals. *Research in Microbiology*, 141, 1069-1072.
- Reizer J., Reizer A. und Saier M.H. (1994). A functional superfamily of sodium/solute symporters. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1197, 133-166.
- Richly H., Rape M., Braun S., Rumpf S., Hoege C., und Jentsch S. (2005). A Series of Ubiquitin Binding Factors Connects CDC48/p97 to Substrate Multiubiquitylation and Proteasomal Targeting. *Cell*, 120, 73-84.
- Ring G. und Eichler J. (2004). Extreme secretion: protein translocation across the archaeal plasma membrane. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*, 36, 35-45.
- Rockel B., Walz J., Hegerl R., Peters J., Typke D. und Baumeister W. (1999). Structure of VAT, a CDC48/p97 ATPase homologue from the archaeon *Thermoplasma acidophilum* as studied by electron tomography. *FEBS Letters*, 451, 27-32.
- Roepstorff P. und Fohlman J. (1984). Proposal for a common nomenclature for sequence ions in mass spectra of peptides. *Biomedical Mass Spectrometry*, 11 (11), 601-601.
- Rose R. W., Bruser T., Kissinger J. C. und Pohlschröder M. (2002). Adaptation of protein secretion to extremely high-salt conditions by extensive use of the twin-arginine translocation pathway. *Molecular Microbiology* 45 (4), 943-950.
- Ruepp A., Graml W., Santos-Martinez M.-L., Koretke K. K., Volker C., Mewes 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 (4839), 487-491.

- Santoni V., Molloy M. und Rabilloud T. (2000). Membrane proteins and proteomics: Un amour impossible? *Electrophoresis*, 21, 1054-1070.
- Sára M. und Sleytr U. B. (1987). Molecular-sieving through S-layers of *Bacillus stearothermophilus* strains. *Journal of Bacteriology*, 169, 4092-4098.
- Sára M. und Sleytr U. B. (2000). S-Layer Proteins. *Journal of Bacteriology*, 182 (4), 859-868.
- Schägger H. und von Jagow G. (1987). Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Analytical Biochemistry*, 166 (2), 368-379.
- Schäfer T., Martina Selig M. und Schönheit P. (1993). Acetyl-CoA synthetase (ADP forming) in archaea, a novel enzyme involved in acetate formation and ATP synthesis. *Archives of Microbiology*, 159, 72-83.
- Schirmer T. (1998). General and specific porins from bacterial outer membranes. *Journal of Structural Biology*, 121, 101-109.
- Schultz J. E. und Matin A. (1991). Molecular and Functional Characterization of a Carbon Starvation Gene of *Escherichia coli*. *Journal of Molecular Biology*, 218, 129-140.
- Schulz G. E. (1996). Porins: general to specific, native to engineered passive pores. *Current Opinion in Structural Biology*, 6, 485-490.
- Schuster K. U. (2003). Der Surface Layer von "Nanoarchaeum equitans": Elektronenmikroskopische, proteinbiochemische und immunologische Untersuchungen. *Diplomarbeit am Lehrstuhl für Mikrobiologie an der Universität Regensburg*
- Shevchenko A., Wilm M., Vorm, O. und Mann M. (1996). Mass spectrometric sequencing of proteins silver-stained polyacrylamide gels. *Analytical Chemistry*, 68, 850-858.
- 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 (6800), 81-86.
- Sleytr U.B. und Messner P. (1988). Cristalline surface layers in procaryotes. *Journal of Bacteriology*, 170 (7), 2891-2897.
- Smith P. K., Krohn R. I., Hermanson G. T., Mallia A. K., Gartner F. H., Provenzano M. D., Fujimoto E. K., Goekke N. M., Olson B. J. und Klenk D. C. (1985). Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Analytical Biochemistry*, 150 (1), 76-85.
- Snowden L. J., Blumentals I. I. und Kelly R. M. (1992). Regulation of Proteolytic Activity in the Hyperthermophile *Pyrococcus furiosus*. *Applied and Environmental Microbiology*, 58, 1134-1141.
- Stark G. R. (1965). Reactions of cyanate with functional groups of proteins. III. Reactions with amino and carboxyl groups. *Biochemistry*, 4 (6), 1030-1306.
- Stahlberg H., Müller D. J., Suda K., Fotiadis D., Engel A., Meier T., Matthey U. und Dimroth P. (2001). Bacterial  $\text{Na}^+$ -ATP synthase has an undecameric rotor. *EMBO Reports*, 2, 229-233.
- Stetter K. O., König H. und Stackebrandt E. (1983). *Pyrodictium* gen. nov., a new genus of submarine disc-shaped sulfur reducing archaeabacteria growing optimally at 105°C. *Systematic and Applied Microbiology*, 4, 1131-1137.
- Stetter K. O. (1989). Extremely thermophilic chemolithoautotrophic archaeabacteria. In: H.G. Schlegel und B. Bowien (Hrsg.), *Autotrophic Bacteria*. Springer, Berlin, Heidelberg, London, Paris, Tokyo, New York, 167-176.
- Stock D., Leslie A. G. und Walker J. E. (1999). Molecular architecture of the rotary motor in ATP synthase. *Science*, 286, 1700-1705.

- Szabó Z., Stahl A. O., Albers S. V., Kissinger J. C., Driessen A. J. M. und Pohlschröder M. (2007). Identification of Diverse Archaeal Proteins with Class III Signal Peptides Cleaved by Distinct Archaeal Preproteases. *Journal of Bacteriology*, 189 (3), 772-778.
- Tanaka K., Waki H., Ido Y., Akita S., Yoshida Y. und Yoshida T. (1988). Protein and polymer analyses up to m/z 100,000 by laser ionization time-of-flight mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 2 (8), 151-153.
- Tusnady G. E. und Simon I. (2001). The HMMTOP transmembrane topology prediction server. *Bioinformatics*, 17 (9), 849-850.
- Twine S. M., Mykytczuk N. C. S., Petit M., Tremblay T. L., Conlan J. W. und Kelly J. F. (2005). *Francisella tularensis* proteome: Low levels of ASB-14 facilitate the visualization of membrane proteins in total protein extracts. *Journal of Proteome Research*, 4, 1848-1854.
- Voges D. und Jap B. J. (1998). Recombinant expression, purification and characterization of Kch, a putative *Escherichia coli* potassium channel protein. *FEBS Letters*, 429, 104-108.
- Walker J. E., Saraste M., Runswick M. J. und Gay N. J. (1982). Distantly related sequences in the alpha and beta-subunits of ATP synthase, myosin, kinases and other ATP requiring enzymes and a common nucleotide binding fold. *EMBO Journal*, 1, 945-951.
- Walter P., Klein F., Lorentzen E., Ilchmann A., Klug G. und Evguenieva-Hackenberg E. (2006). Characterization of native and reconstituted exosome complexes from the hyperthermophilic archaeon *Sulfolobus solfataricus*. *Molecular Microbiology*, 62 (4), 1076-1089.
- Walz T. und Grigorieff N. (1998) Electron crystallography of two-dimensional crystals of membrane proteins. *Journal of Structural Biology*, 121, 142-161.
- Washburn M.P., Wolters D. und Yates J.R. (2001). Large-scale analysis of the yeast proteome by multidimensional protein identification technology. *Nature Biotechnology*, 19, 242-247.
- Wasserburger N. (2008). Anzucht, elektronenmikroskopische Präparation und Darstellung der archaeellen Cokultur von *Ignicoccus hospitalis* und *Nanoarchaeum equitans*. *Diplomarbeit am Lehrstuhl für Mikrobiologie der Universität Regensburg*.
- Watanabe S., Kita A. und Miki K. (2005). Crystal Structure of Atypical Cytoplasmic ABC-ATPase SufC from *Thermus thermophilus* HB8. *Journal of Molecular Biology*, 353, 1043-1054.
- Waters E., Hohn M. J., Ahel I. und Graham D. E., et al. (und 18 weitere Coautoren) (2003). The genome of *Nanoarchaeum equitans*: Insights into early archaeal evolution and derived parasitism. *PNAS*, 100, 12984-12988.
- Weber P. (1997). Overview of Protein Crystallization Methods. *Methods in Enzymology*, 276, 13-22.
- Wiechelman K. J., Braun R. D. und Fitzpatrick J. D. (1988). Investigation of the bicinchoninic acid protein assay: Identification of the groups responsible for color formation. *Analytical Biochemistry*, 175 (1), 231-237.
- Wiese A., Reiners J. O., Brandenburg K., Kawahara K., Zahringer U. und Seydel U. (1996). Planar asymmetric lipid bilayers of glycosphingolipid or lipopolysaccharide on one side and phospholipids on the other: Membrane potential, porin-function, and complement activation. *Biophysical Journal*, 70, 321-329.

- Williams K. A., Geldmacher- Kaufer U., Padan E., Schuldiner S. und Kühlbrandt W. (1999). Projection structure of NhaA, a secondary transporter from *Escherichia coli*, at 4.0 Å resolution. *The EMBO Journal*, 18 (13), 3558-3563.
- Withmore L. und Wallace B. A. (2004). DICHROWEB, an online server for protein secondary structure analyses from circular dichroism spectroscopic data. *Nucleic Acids Research*, 32, W668-W673.
- Withmore L. und Wallace B. A. (2008). Protein secondary structure analyses from circular dichroism spectroscopy. *Biopolymers*, 89, 392-400.
- Woese C. R. und Fox G. E. (1977). Phylogenetic structure of the prokaryotic domain: The primary kingdoms. *PNAS*, 74, 5088-5090.
- Woese C. R. (1987). Bacterial evolution. *Microbiological Reviews*, 51 (2), 221-271.
- Woese C. R., Kandler O. und Wheelis M.L. (1990). Towards a natural system of organisms: Proposal for the domains Archaea, Bacteria, and Eucarya. *PNAS*, 87, 4576-4579.
- Wood Z.A., Schröder E., Robin Harris J. und Poole L. B. (2003). Structure, mechanism and regulation of peroxiredoxins. *Trends in Biochemical Science*, 28, 32-40.
- Yu W. W., Aires J. R. und Nikaido H. (2003). AcrB Multidrug Efflux Pump of *Escherichia coli*: Composite Substrate-Binding Cavity of Exceptional Flexibility Generates Its Extremely Wide Substrate Specificity. *Journal of Bacteriology*, 185 (19), 5657-5664.
- Zeth K., Diederichs K., Welte W. und Engelhardt H. (2000). Crystal structure of Omp32, the anion-selective porin from *Comamonas acidovorans*, in complex with a periplasmic peptide at 2.1 Å resolution. *Structure*, 8, 981-992.
- Zillig W., Prangishvili D., Schleper C., Elferink M., Holz I., Albers S. V., Janekovic D. und Götz D. (1996). Viruses, plasmids and other genetic elements of thermophilic and hyperthermophilic Archaea. *FEMS Microbiology Reviews*, 18 (2-3), 225-236.
- Zillig W., Arnold H. P., Holz I., Prangishvili D., Schweier A., Stedman K., She Q., Phan H., Garrett R. A. und Kristjansson J. K. (1998). Genetic elements in the extremely thermophilic archaeon *Sulfolobus*. *Extremophiles*, 2, 131-140.



# Danksagung

An dieser Stelle möchte ich all denen danken, die durch ihre Unterstützung zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Meinem Doktorvater, Herrn PD Dr. Reinhard Rachel, danke ich für seine ausgezeichnete wissenschaftliche Betreuung und unermüdliche Diskussionsbereitschaft. Seine zahlreichen konstruktiven Anregungen und Ideen haben entscheidend zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen und mich stets zur Realisierung eigener Ideen motiviert. Danke für alle Mittel und Freiheiten und die wertvolle Unterstützung bei der Anfertigung dieser Arbeit.

Ich danke Herrn Professor Ralph Witzgall für die Möglichkeit, den wesentlichen Teil dieser Arbeit an seinem Lehrstuhl durchzuführen zu können. Vielen Dank für die freundliche Aufnahme an ihrem Institut und das ausgezeichnete Arbeitsklima.

Herrn Professor Reinhard Wirth danke ich für seine großzügige Förderung und freundliche Unterstützung in den vergangenen Jahren. Sie waren mir immer eine große Hilfe.

Herrn Prof. Dr. Rainer Deutzmann und Herrn Eduard Hochmut danke ich für die fruchtbare Zusammenarbeit bezüglich der vielen Sequenzierungen und massenspektrometrischen Analysen schier unzähliger *I. hospitalis*- und *N. equitans*-Proteine.

Vielen Dank auch an Herrn Dr. Rainer Merkl, Herrn Dr. Patrick Babinger und Herrn Klaus-Jürgen Tiefenbach für die stets unkomplizierte Unterstützung in Sachen Genomanalyse und Proteinanalytik. Durch sie wurde mein Interesse an der Bioinformatik geweckt.

Wolfram Gronwald danke ich für die freundliche Hilfe bei der Erstellung des 3D-Modells der Ihomp1-Monomere.

Ich danke Frau Dr. Caroline Peneff (X-Ray), Frau Lucie Sokolova (LILBID-MS), Herrn Dr. Frank Siedler (ESI Nano-LC MS/MS) und Herrn Dr. Dirk Linke (artificial membranes), welche sich für das Ihomp1-Projekt begeistern ließen und mich auf dem Weg der Charakterisierung dieses ungewöhnlichen Proteins stets mit Rat und Tat unterstützt und begleitet haben. Die externen Arbeiten waren ein besonders attraktiver Aspekt der Arbeit.

Herzlichen Dank den Mitgliedern meiner beiden Heimatlehrstühle, der Mikrobiologie und der Anatomie, die meine Arbeit immer unterstützt und so überhaupt möglich gemacht haben.

Den vielen Doktoranden, Diplomanden und Praktikanten die meine Arbeit begleitet haben, allen voran Dr. Daniela J. Näther, Anne-Sarah Raschta, Sonja Gürster, Carolin Meyer, Astrid Neumann, Jürgen Kastner, Thomas Menzel und Andreas Klingel, möchte ich für die Freundschaft und vielen wissenschaftlichen und unwissenschaftlichen Diskussionen danken – danke für die fröhliche und angenehme Atmosphäre, es war stets eine Freude mit euch zu arbeiten!

Eva: Ich danke dir für deine Entbehrungen, für das Begleiten durch alle Höhen und Tiefen während der letzten Monate und für deinen seelischen und moralischen Ausgleich an so manchem Wochenende.

Zu guter Letzt möchte ich meinen Eltern, meiner Familie und allen Freunden danken, die mich im Verlauf meines Studiums und während dieser Arbeit immer mit voller Kraft unterstützt und motiviert haben. Danke, ihr seid mein Rückhalt.



## **Ehrenwörtliche Erklärung**

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

Regensburg, Januar 2009



# **Curriculum Vitae**

## **Persönliche Daten**

Name: Tillmann Burghardt  
Geburtsname: Kreher  
geboren am: 20.11.1979 in Sondershausen  
Familienstand: ledig  
Nationalität: deutsch

## **Schulbildung**

---

1986 - 1990 Grundschule Holzthaleben  
1990 - 1991 Realschule Keula  
1991 - 1998 Albert-Schweitzer-Gymnasium in Mühlhausen (Thüringen)  
Abschluss: allgemeine Hochschulreife

## **Hochschulbildung** **Universität Regensburg**

---

1999 - 2005 Studium der Biologie und Diplomarbeit mit dem Thema  
„Isolierung und Charakterisierung der Proteine der äußeren  
Membran von *Ignicoccus hospitalis*“ unter der Betreuung von PD.  
Dr. R. Rachel, Lehrstuhl für Mikrobiologie und Zentrum für  
Elektronenmikroskopie

## **Promotion** **Universität Regensburg**

---

Seit Juni 2005 Promotion mit dem Thema "Einblicke in die Interaktion zwischen  
*Ignicoccus hospitalis* und *Nanoarchaeum equitans*: Das  
Membranprotein Ihomp1 sowie Nachweis weiterer Proteine der  
Zellhüllen" unter der Betreuung von PD. Dr. R. Rachel, Lehrstuhl  
für Mikrobiologie und Zentrum für Elektronenmikroskopie