

**Untersuchung der Mth60-Fimbrien von
*Methanothermobacter thermoautotrophicus***



DISSERTATION

ZUR ERLANGUNG DES DOKTORGRADES
DER NATURWISSENSCHAFTEN (DR. RER. NAT.)
DER FAKULTÄT FÜR BIOLOGIE UND VORKLINISCHE MEDIZIN
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

vorgelegt von

Christina Sarbu

aus

Reschitz/Rumänien

im Jahr 2013

Das Promotionsgesuch wurde eingereicht am: 05. Februar 2013

Die Arbeit wurde angeleitet von: Prof. Dr. Reinhard Wirth

Unterschrift: _____

Inhaltsverzeichnis

I	Einleitung	1
II	Material und Methoden	10
1	Bezugsquellen	10
1.1	Chemikalien und Biochemikalien	10
1.2	Reaktionskits und Chromatographiesäulen	11
1.3	Enzyme	12
1.4	Molekularmassenstandards und Ladepuffer	12
1.5	Vektor und Oligonukleotide	12
1.6	Antikörper	13
1.7	Verbrauchsmaterialien	14
1.8	Glaswaren	15
1.9	Geräte	15
1.10	Organismen	16
2	Kulturmedien und Anzucht der Mikroorganismen	17
2.1	MS-Medium (Balch <i>et al.</i> , 1979), modifiziert	17
2.1.1	Zusammensetzung des MS-Kulturmediums	17
2.1.2	Herstellung im Labormaßstab	19
2.1.3	Großtechnische Herstellung im Fermenter	19
2.1.4	Kultivierung der Organismen	19
2.1.5	Anzucht auf festen Oberflächen	20
2.2	LB-Medium (Miller, 1972)	20
2.2.1	Zusammensetzung des LB-Kulturmediums	20
2.2.2	Herstellung als Flüssigmedium und Agarplatten	20
2.2.3	Kultivierung	21
3	Sterilisation	21
4	Molekulargenetische Methoden	21
4.1	Isolierung von genomischer DNA	21
4.1.1	Zellaufschluss	22
4.1.2	Isolierung und Reinigung der DNA	22
4.2	Isolierung von Gesamt-RNA	23
4.2.1	Hinweise zur Arbeit mit RNA	23
4.2.2	Zellaufschluss	23
4.2.3	Isolierung und Reinigung der RNA	24
4.3	Quantifizierung von Nukleinsäuren	24
4.4	Reverse Transkription	24
4.5	Agarose-Gelelektrophorese	25
4.6	Polymerase-Chain-Reaction (PCR)	26
4.6.1	Standard-PCR für anschließende Klonierung	26
4.6.2	Quantitative Reverse-Transkriptions-PCR (qRT-PCR)	27
4.6.2.1	Überprüfung der Qualität der Primerpaare	27
4.6.2.2	Analyse der Transkriptmengen	28
4.7	Klonierung	29
4.7.1	Restriktionshydrolyse	29
4.7.2	Ligation	29
4.7.3	Herstellung kompetenter Zellen	30
4.7.4	Transformation in kompetente <i>E. coli</i> -Zellen	30

4.7.5	Isolierung von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i>	31
4.7.6	Screening der Klone	31
4.7.7	DNA-Sequenzierung und Sequenzdatenanalyse	31
4.7.8	Anlegen von Glycerinkulturen.....	31
4.7.9	Erstellung und Klonierung des Genkonstruktes <i>mth60/mth59</i>	32
5	Proteinbiochemische Methoden.....	32
5.1	Isolierung und Aufreinigung von Fimbrien.....	32
5.1.1	Zellernte.....	32
5.1.2	Isolierung über Ultra-Turrax-Behandlung	33
5.1.3	Isolierung aus dem Zentrifugationsüberstand	33
5.1.4	Isolierung mittels Pseudomuramidase PeiP	33
5.1.5	Cäsiumchlorid-Dichtegradientenzentrifugation	34
5.1.6	Dialyse der Fraktionen.....	34
5.2	Zellaufschluss zur Analyse von Proteinen.....	34
5.3	Heterologe Genexpression in <i>E. coli</i>	35
5.3.1	Induktion der Proteinexpression.....	36
5.3.2	Aufreinigung über Affinitätschromatographie	37
5.3.2.1	Nickel-Chelat-Affinitätschromatographie.....	37
5.3.2.2	Antikörper-Affinitätschromatographie	37
5.3.3	Dialyse	38
5.3.4	Abspaltung des His-Tags.....	38
5.4	Bestimmung von Proteinkonzentrationen.....	39
5.5	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	39
5.5.1	Herstellung der Gele	39
5.5.2	Diskontinuierliche SDS-PAGE nach Laemmli (1970)	40
5.5.3	Diskontinuierliche SDS-PAGE nach Schägger und Jagow (1987)	40
5.5.4	Probenvorbereitung und Elektrophoresebedingungen	40
5.5.5	Färbung von SDS-Gelen.....	41
5.5.6	Trocknung von SDS-Gelen	42
5.6	Western Blot	42
5.6.1	Transfer der Proteine auf PVDF-Membran (Towbin <i>et al.</i> , 1979)	42
5.6.2	Färbung mit Ponceau S.....	43
5.6.3	Immunologischer Nachweis.....	43
5.7	Polymerisationsstudien	44
5.8	Untersuchung von Protein-Protein-Interaktionen	45
5.8.1	Co-Immunpräzipitation	45
5.8.1.1	Bindung der Antikörper an das Säulenmaterial.....	45
5.8.1.2	Vorbereitung der Proteinlösungen	46
5.8.1.3	Durchführung der Co-Immunpräzipitation und Elution	46
5.8.2	Gelfiltrations-Chromatographie	46
5.9	Identifizierung von Proteinen.....	47
5.9.1	N-terminale Sequenzierung über Edman-Abbau.....	47
5.9.2	Proteolytischer in-Gel-Verdau und MALDI-TOF MS/MS	47
5.9.3	LC/MS	48
5.10	Bioinformatische Analysen	48
6	Mikroskopie	49
6.1	Phasenkontrastmikroskopie	49
6.2	Transmissionselektronenmikroskopie (TEM).....	49
6.3	Rasterelektronenmikroskopie (REM)	50

7	Elektronenmikroskopische Präparationstechniken.....	50
7.1	Herstellung und Kontrastierung von Suspensionspräparaten	50
7.2	Herstellung von Ultradünnschnitten	51
7.2.1	Probenvorbereitung und High Pressure Freezing (HPF)	51
7.2.2	Gefriersubstitution	51
7.2.3	Infiltration und Einbettung	52
7.2.4	Vorbereitung der eingebetteten Proben.....	53
7.2.5	Ultramikrotomie	53
7.3	Immunmarkierung für die Elektronenmikroskopie.....	53
7.3.1	Immunmarkierung an Suspensionspräparaten und bewachsenen Gold-Grids ..	54
7.3.2	Immunmarkierung an Ultradünnschnitten.....	55
8	Generierung und Aufreinigung polyklonaler Antikörper.....	56
8.1	Generierung primärer Antikörper gegen Mth59.....	56
8.2	Generierung primärer Antikörper gegen die Mth60-Fimbrien	56
8.3	Aufreinigung polyklonaler Kaninchen IgG-Antikörper.....	56
8.4	Aufreinigung polyklonaler Huhn IgY-Antikörper	57
III	Ergebnisse.....	58
1	Bestimmung der Transkriptmengen der <i>mth60</i>-Gencluster	58
1.1	RNA-Isolierung und reverse Transkription	58
1.2	Bestimmung der Effizienz der Primerpaare	59
1.3	Untersuchung der Transkriptmengen	59
2	Bioinformatische Analysen	61
3	Klonierung und Expression.....	64
3.1	Klonierung und Expression der Gensequenz <i>mth61-mth58</i>	64
3.2	Klonierung und Expression des Genkonstruktes <i>mth60/mth59</i>	65
3.3	Klonierung und Expression von <i>mth59</i> sowie Antikörpergenerierung	69
3.4	Klonierung und Expression von <i>mth61</i>	71
3.5	Klonierung und Expression von <i>mth58</i>	71
3.6	Expression der Pseudomurein-Endoisopeptidase PeiP	72
4	Charakterisierung der Mth60-Fimbrien von <i>M. thermoautotrophicus</i>	72
4.1	Isolierung und Analyse der Fimbrien	72
4.1.1	Isolierung aus dem Zellpellet mittels Ultra-Turrax.....	72
4.1.2	Isolierung aus dem Zentrifugationsüberstand über PEG-Fällung.....	73
4.1.3	Isolierung aus dem Zellpellet mittels Pseudomuramidase PeiP	75
4.2	Versuche zur Identifizierung weiterer Fimbrienproteine.....	76
4.3	Elektronenmikroskopie der Fimbrien adhärenter Zellen	78
4.3.1	Transmissionselektronenmikroskopie	78
4.3.2	Rasterelektronenmikroskopie	81
4.4	Generierung, Aufreinigung und Analyse von anti-Mth60-Fimbrien Antikörper	81
4.5	Immunmarkierungen mit anti-Mth60-Fimbrien Antikörper	82
5	Untersuchung der Zellanhänge verwandter methanogener Archaeen.....	86
5.1	Isolierung und Analyse der Fimbrien von <i>M. marburgensis</i>	86
5.1.1	Isolierung über PEG-Fällung	86
5.1.2	Isolierung über Behandlung mit PeiP	87
5.2	Isolierung und Analyse der Fimbrien von <i>M. fervidus</i>	88
5.2.1	Isolierung über PEG-Fällung	89
5.2.2	Isolierung über Behandlung mit PeiP	89

5.3	Versuche zur Identifizierung der Fimbrine.....	90
5.4	Überprüfung auf Kreuzreaktionen mit anti-Mth60-Fimbrien Antikörper	91
6	Studien zur Funktion und Lokalisation von Mth59.....	92
6.1	Überprüfung der Funktion von Mth59	92
6.1.1	Co-Immunpräzipitationen	92
6.1.2	Gelfiltrations-Chromatographie	97
6.2	Überprüfung der Lokalisation von Mth59.....	98
6.2.1	Immunmarkierungen an elektronenmikroskopischen Präparaten	98
6.2.2	Immunmarkierungen an Western- und Dot Blots	98
7	Polymerisationsstudien.....	100
7.1	Variation von Temperatur und Inkubationsdauer	100
7.2	Einfluss zweiwertiger Ionen	105
7.3	Einfluss von Mth59.....	108
IV	Diskussion.....	111
1	Quantitative Analysen der mit <i>mth60</i> co-transkribierten Gene.....	111
2	Charakterisierung der Mth60-Fimbrien von <i>M. thermoautotrophicus</i>.....	116
2.1	Isolierung der Mth60-Fimbrien	116
2.2	Elektronenmikroskopische Analyse der Mth60-Fimbrien.....	117
2.2.1	Ultrastruktur.....	117
2.2.2	Dünnere Filamente.....	118
2.2.3	Endständige Strukturen.....	119
2.2.4	Immunmarkierungen mit Fimbrien-spezifischen Antikörpern	120
2.2.5	„Leiterähnliche“ Strukturen.....	121
2.3	Versuche zur Identifizierung der Fimbrien-Proteine	122
2.4	Vergleich der Mth60-Fimbrien mit den Fimbrien verwandter Methanogener.....	123
3	Heterologe Genexpression in <i>E. coli</i>	125
4	Mth59 und seine Funktion bei der Assemblierung der Mth60-Fimbrien	127
5	Polymerisationsstudien.....	131
6	Fazit	135
V	Zusammenfassung	137
VI	Anhang	139
1	Abkürzungsverzeichnis.....	139
2	Nukleotid- und Aminosäuresequenzen	140
3	Auswertung der qRT-PCR	141
4	Ergänzende Abbildungen	143
5	Begleit-CD	145
VII	Literaturverzeichnis.....	146

I Einleitung

Im Jahr 1776 entdeckte der italienische Physiker und Naturforscher Alessandro Volta das Aufsteigen von Gasblasen aus Sumpfsedimenten, nachdem er den Schlamm des Lago Maggiore aufrührte. Diese Sumpfgase leitete er zum Ziele einer Untersuchung mithilfe eines Trichters in ein Glasgefäß und machte die Beobachtung, dass sie



Abb. I.1: Zeichnung des von Volta durchgeführten Experimentes (aus Wolfe, 1993).

nach dem Entzünden mit einer bläulichen Flamme verbrannten. Bei dieser „brennbaren Luft“ handelte es sich, wie später ermittelt wurde, um den Kohlenwasserstoff Methan. Seit Voltas Beobachtungen verging etwa ein Jahrhundert, bis Wissenschaftler herausfanden, dass die Methanbildung in solch anoxischen Lebensräumen auf der Tätigkeit methanogener Mikroorganismen beruht (Wolfe, 1993).

Heute ist bekannt, dass ein Großteil des Methanvorkommens in der Atmosphäre auf diese ursprünglich als Methanbakterien bezeichneten Organismen zurückzuführen ist, die tatsächlich zur Domäne der Archaeen gehören. Diese Domäne wurde erst im Jahr 1977 von Carl Woese und George Fox unter dem Begriff „Archaeobakterien“ postuliert und sollte eine Abgrenzung von den (Eu-)Bakterien schaffen (Woese & Fox, 1977). Die Basis dieser Reklassifizierung bildeten 16S rRNA-Analysen, die zeigten, dass die methanogenen Mikroorganismen deutliche Unterschiede zu allen bis dahin sequenzierten Pro- und Eukaryoten aufwiesen. Die Daten gewannen an Bedeutung, als weitere Organismen mit ähnlichen 16S rRNA-Sequenzen gefunden, sowie einzigartige Charakteristika der Archaeobakterien bestimmt wurden (Woese *et al.*, 1978). Seit 1990 werden die drei Domänen des Lebens offiziell Archaeen, Bakterien und Eukaryoten genannt. Dabei wurde die Bezeichnung Archaeobakterien verworfen, da diese fälschlicherweise eine engere Beziehung der Archaeen zu den Bakterien als zu den Eukaryoten vermuten lässt (Woese *et al.*, 1990).

Der Begriff Archaeum stammt aus dem Griechischen (archaios: alt, ursprünglich) und deutet bereits auf die frühzeitige Abzweigung dieser Organismen im phylogenetischen Baum hin. Auch wenn nicht alle Archaeen sogenannte Extremophile sind, so bevorzugen viele von ihnen dem Menschen lebensfeindlich erscheinende Biotope, die (vermutlich) den Bedingungen zu Beginn des Lebens nahe kommen. Zu diesen Biotopen zählen z.B. jene mit extremen pH-Werten (Acidophile, Alkaliphile), hohen Salzkonzentrationen (Halophile), sauerstofffreie Lebensräume (Anaerobier) sowie Habitate, in denen hohe Temperaturen vorherrschen (Thermophile). Besonders interessant ist hierbei die Hyperthermophilie, in deren Fall sich die Organismen durch eine optimale Wachstumstemperatur von mindestens 80°C auszeichnen.

Das Archaeum mit der bis jetzt höchsten bekannten optimalen Wachstumstemperatur von 106°C ist *Pyrolobus fumarii* (Blöchl *et al.*, 1997). Da die Hyperthermophilie nicht nur auf Archaeen beschränkt, sondern auch bei den im phylogenetischen Stammbaum tief wurzelnden Bakterien vertreten ist (Huber *et al.*, 1986; 1992; 1998), wird sie als ursprüngliches Merkmal bei der Entstehung des Lebens angesehen (Di Giulio, 2003; Stetter, 2006).

Die Domäne der Archaeen wird in die beiden Hauptphyla Crenarchaeota und Euryarchaeota unterteilt (Woese *et al.*, 1990), zu denen die meisten heute bekannten Archaeen zugeordnet werden. Ein weiteres Phylum stellen die Korarchaeota dar (Barns *et al.*, 1996). Ihre Existenz wurde in verschiedenen Umweltproben belegt, wobei nur „*Candidatus Korarchaeum cryptophilum*“ näher charakterisiert werden konnte (Elkins *et al.*, 2008). Im Jahr 2002 wurde mit den Nanoarchaeota ein neues Phylum eingeführt (Huber *et al.*, 2002), das momentan als einzigen Vertreter *Nanoarchaeum equitans* enthält. Dieses kleinste heute bekannte Archaeum (Durchmesser 400 nm) kann nicht alleine, sondern nur in Kokultur mit dem Crenarchaeoten *Ignicoccus hospitalis* leben. Als weiteres Phylum wurden die Thaumarchaeota vorgeschlagen (Brochier-Armanet *et al.*, 2008), zu denen unter anderem aerobe Ammonium-Oxidierer gezählt werden (Spang *et al.*, 2010).

Zu den Euryarchaeota gehören neben den Halophilen auch alle methanogenen Archaeen, wobei davon auszugehen ist, dass die fünf Ordnungen *Methanobacteriales*, *Methanococcales*, *Methanomicrobiales*, *Methanopyrales* und *Methanosarcinales* keine monophyletische Gruppe bilden (Baptiste *et al.*, 2005; Anderson *et al.*, 2009). Allen Methanogenen gemeinsam ist die Produktion ihres charakteristischen Stoffwechselproduktes Methan aus „Abfallprodukten“ anderer Mikroorganismen. Als Substrate für die Methanogenese, die aufgrund der Sauerstoffsensitivität der beteiligten Enzyme nur unter strikt anaeroben Bedingungen stattfindet, dienen einige wenige Ausgangsstoffe wie CO₂, Formiat, Acetat, Methanol oder Methylamine (Whitman *et al.*, 2006). Trotz dieses geringen Substratspektrums haben die Methanogenen zahlreiche anoxische Habitate erobert. So finden sie sich zusätzlich zu den von Volta beobachteten Sumpfgebieten auch in den Sedimenten von Flüssen und Meeren, im Verdauungstrakt von Tieren (Rinder, Termiten) und Menschen, in Reisfeldern, geothermalen und hydrothermalen Quellen sowie in Klärschlammanlagen (Zinder, 1993). Basierend auf diesen unterschiedlichen Lebensräumen weisen die Methanogenen ein breites Spektrum an Zellmorphologien, variierenden GC-Gehalten und unterschiedlich aufgebauten Zellhüllen auf (Holt *et al.*, 2000). Bei letzteren handelt es sich um komplexe Polymere, wie z.B. Pseudopeptidoglykan (Pseudomurein), Methanochondroitin sowie S-Layer aus (Glyko-)Proteinen (Huber, 2006). Ein weiteres Charakteristikum stellen auch verschiedenartige Zellanhänge dar, die den Organismen die Fähigkeit zur Fortbewegung oder Adhäsion an Oberflächen bzw. an anderen Zellen verleihen.

Bei den Fortbewegungsorganellen handelt es sich per Definition in erster Linie um Flagellen (Geißeln). Flagellation ist unter Mikroorganismen ein weit verbreitetes Phänomen und findet sich bei zahlreichen Bakterien und Archaeen. Als für *Halobacterium salinarum* (früher *H. halobium*) gezeigt werden konnte, dass das Schwimmverhalten dieses Archaeums auf einer Rotation der Flagellen basiert und diese ihre Rotationsrichtung ähnlich wie Bakterien ändern können (Alam & Oesterhelt, 1984; Marwan *et al.*, 1991), wurde angenommen, dass sich die bakteriellen und archaeellen Flagellen nicht nur funktionell, sondern auch strukturell gleichen. Heute weiß man allerdings, dass sie sich grundlegend voneinander unterscheiden.

So sind bakterielle Flagellen typischerweise etwa 20 nm dick und verfügen über einen zentralen Kanal mit 2 nm Durchmesser. Durch diesen Hohlraum werden die Proteinuntereinheiten nach außen transportiert, womit die Verlängerung der bakteriellen Flagelle an der Spitze erfolgt. Das Flagellum besteht aus einem Filament, das in der Regel aus einem einzigen Flagellin aufgebaut und über einen 55 nm langen Haken mit dem Basalkörper verbunden ist. Der Basalkörper verankert das Flagellum über Ringstrukturen in der Cytoplasmamembran (MS-Ring) und bei Gram-negativen Bakterien zusätzlich in der Peptidoglykanschicht (P-Ring), sowie der äußeren Membran (L-Ring). Diese Ringstrukturen stehen in engem Kontakt mit den Motorproteinen, die für die Rotation der Zellanhänge benötigt werden. Das erzeugte Drehmoment wird dabei über den Haken an das starre Filament weitergeleitet, so dass die Flagelle in Rotation versetzt wird (Macnab, 2003).

Im Gegensatz zu den bakteriellen Geißeln existieren nur wenig Daten zu Struktur und möglicher Assemblierung der archaeellen Flagellen, obgleich sie die bestuntersuchtesten Zellanhänge der Archaeen darstellen. Zwar sind die archaeellen Flagellen ebenfalls aus Filament, Haken und Basalkörper aufgebaut (Cruden *et al.*, 1989), weisen jedoch grundlegende Unterschiede zu ihren bakteriellen Gegenstücken auf. So sind sie mit einem Durchmesser von 10-14 nm erheblich dünner (Jarrell & Koval, 1989; Cruden *et al.*, 1989). Ferner fehlt ihnen ein Zentralkanal, weswegen eine Assemblierung von der Basis her vermutet wird (Cohen-Krausz und Trachtenberg, 2008). Diese Theorie wird dadurch bestärkt, dass spezielle *Methanococcus maripaludis*-Mutanten hakenlose Flagellenfilamente bilden können (Chaban *et al.*, 2007), was nur dann möglich erscheint, wenn die Assemblierung des Filamentes vor der des Hakens stattfindet. Gegen eine Ähnlichkeit zwischen bakteriellen und archaeellen Flagellen spricht zudem, dass sich im Genom der Archaeen keinerlei Homologien zu den Proteinen finden, die an der Assemblierung der bakteriellen Geißel beteiligt sind (Faguy & Jarrell, 1999). Um eine Abgrenzung der beiden Strukturen voneinander zu schaffen, wurde für die archaeelle Flagelle kürzlich der Begriff „Archaeellum“ vorgeschlagen (Jarrell & Albers, 2012).

Archaeelle Flagellen weisen vielmehr eine deutliche Ähnlichkeit zu den Typ IV-Pili Gram-negativer Bakterien auf. So sind beide Zellanhänge aus mehreren, glykosylierten Flagellinen bzw. Pilinen aufgebaut, die in unterschiedlichen Anteilen in den Filamenten vertreten sind und demnach als Haupt- und Neben-Flagelline bzw. -Piline bezeichnet werden (Bardy *et al.*, 2004). Im Gegensatz zu den bakteriellen Flagellinen werden archaeelle Flagelline und Typ IV-Piline als Prä-Proteine mit einem Klasse III-Signalpeptid synthetisiert, das von einer membranassoziierten Signalpeptidase erkannt und abgespalten wird. Dabei ist die archaeelle Peptidase (FlaK bzw. PibD) homolog zu der bakteriellen Typ IV Prä-Pilin-Peptidase (Bardy & Jarrell, 2003; Albers *et al.*, 2003). Weitere Homologien auf Proteinebene finden sich in der konservierten ATPase FlaI sowie dem konservierten Membranprotein FlaJ (Ng *et al.*, 2006).

Flagellen sind an der Zelloberfläche zahlreicher Archaeen lokalisiert und ermöglichen ihnen, wie kürzlich für *Methanocaldococcus jannaschii* und *Methanocaldococcus villosus* gezeigt wurde, Spitzengeschwindigkeiten von etwa 400 bzw. 500 Körperlängen pro Sekunde zu erreichen (Herzog & Wirth, 2012). Auch wenn Flagellen allgemein als Fortbewegungsorganelle angesehen werden, konnte im Fall von *Pyrococcus furiosus* gezeigt werden, dass sie auch zur Oberflächenadhäsion und Ausbildung von Zell-Zell-Verbindungen dienen (Näther *et al.*, 2006). Gleiche Beobachtungen zur Multifunktionalität der archaeellen Flagellen wurden auch im Fall von *Methanococcus maripaludis* (Jarrell *et al.*, 2011) und *Methanocaldococcus villosus* (Bellack *et al.*, 2011) gemacht. Zusätzlich wurde für *P. furiosus* und verschiedene *Methanocaldococcus*-Arten eine verstärkte Expression der Flagellen beim Wachstum auf Oberflächen verzeichnet (Bellack, 2011).

Die Fähigkeit, an Oberflächen zu adhären, stellt für Archaeen (genauso wie für Bakterien) einen großen Vorteil dar. Auf diese Weise ist es den Organismen möglich, in den favorisierten Habitaten zu verweilen und Biofilme auszubilden, die den Zellen Schutz sowie eine optimalen Nährstoffversorgung bieten (Flemming & Wingender, 2001). Demzufolge haben sich neben den bereits beschriebenen Flagellen bei bestimmten Archaeen auch weitere, einzigartige Zellanhänge entwickelt, die eine Adhäsion ermöglichen. Dabei handelt es sich um die Fibers von *Ignicoccus*, sowie die Hami des SM1-Euryarchaeums, auf die in Folge kurz eingegangen werden soll.

Die 14 nm dicken Fibers von *Ignicoccus hospitalis* wurden im Jahr 2009 als neue archaeelle Zellanhänge beschrieben. Sie bestehen hauptsächlich aus dem 33 kDa Protein Iho670, das keine Homologien zu anderen archaeellen Zellanhängen aufweist (Müller *et al.*, 2009). Da *I. hospitalis* nicht motil ist (Müller *et al.*, 2009; Herzog, 2009) und zudem eine bedeutend größere Anzahl an Fibers bei Wachstum auf kohlebeschichteten Gold-Grids ausbildet, wird davon ausgegangen, dass die Zellanhänge der Adhäsion dienen (Meyer, 2010).

Die Hami des SM1-Euryarchaeums stellen die strukturell auffälligsten archaeellen Zellanhänge dar (siehe Abb. I.2). Die etwa 2 µm langen und zwischen 7 und 8 nm dicken Filamente weisen „stacheldrahtähnliche“ Fortsätze auf (*prickle region*) und münden in eine endständige Struktur, die an einen Enterhaken erinnert (Moissl *et al.*, 2005). Der Bereich des Enterhakens (*hook region*) ist dabei frei von Stacheln. Pro Zelle bildet das SM1-Euryarchaeum etwa 100 dieser Hami aus, die als Adhäsionsorganelle dem Organismus die Bindung an Oberflächen und anderen Zellen ermöglichen (Moissl *et al.*, 2003).

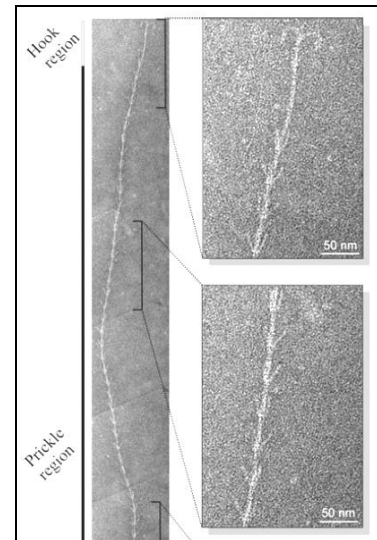


Abb. I.2: Elektronenmikroskopische Aufnahme eines Hamus, negativ kontrastiert (aus Moissl *et al.*, 2005).

Die typischsten, zumindest im Fall der Bakterien eindeutig als Adhäsionsstrukturen verstandenen Zellanhänge stellen allerdings Fimbrien bzw. Pili dar. Die 2 bis 8 nm dünnen

Organelle (Smyth *et al.*, 1996) wurden zunächst bei Gram-negativen (Duguid *et al.*, 1955), später auch bei Gram-positiven Bakterien gefunden (Yanagawa *et al.*, 1968). Ursprünglich sollten Fimbrien Adhäsionsstrukturen bezeichnen und Pili jene Zellanhänge, die im Sinne eines Sex-Pilus dem Gentransfer dienen (Ottow, 1975). Jedoch werden die Begriffe in der Fachliteratur häufig als Synonyme verwendet. Als Beispiele hierfür können die Pap- und Typ 1-Pili uropathogener *Escherichia coli*-Stämme genannt werden, mit deren Hilfe sich die Bakterien an die Epithelien des Wirtsorganismus anheften (Zhang & Normark, 1996; Mulvey *et al.*, 1998).

Die Unterteilung in Fimbrien und Pili wird zudem durch multifunktionelle Zellanhänge erschwert, die, wie im Fall der Typ IV-Pili Gram-negativer Bakterien, zahlreiche Aufgaben übernehmen. So dienen diese Zellanhänge, die bereits aufgrund ihrer Ähnlichkeit zu archaeellen Flagellen genannt wurden, nicht nur zur Aufnahme von DNA, sondern auch zur Adhäsion, Signaltransduktion, Sekretion von Proteasen und Kolonisierungsfaktoren sowie zu einer besonderen Art der Fortbewegung (Craig & Li, 2008). Diese als *twitching motility* bezeichnete Bewegung wird z.B. von *Pseudomonas aeruginosa* und *Neisseria gonorrhoeae* genutzt (Mattick, 2002) und beruht auf einem Zusammenspiel von Polymerisation und Depolymerisation der Typ IV-Piline. Damit kann die *twitching motility* mit dem Auswerfen und Einziehen eines Ankers verglichen werden, wobei sich am distalen Ende der Pili ein Adhäsion befindet. Die schnelle (De-)Polymerisation von mehr als 1000 Untereinheiten pro Sekunde wird durch die in der Cytoplasmamembran eingelagerten Piline bewerkstelligt, die im Periplasma polymerisieren und über eine Pore in der äußeren Membran an die Zelloberfläche gelangen (Bardy *et al.*, 2003).

Bakterielle Fimbrien und Pili sind in der Vergangenheit sehr intensiv erforscht worden, so dass für manche von ihnen sowohl die Ultrastruktur als auch der Assemblierungsmechanismus bis auf molekulare Ebene bekannt sind (Sauer *et al.*, 1999; Hahn *et al.*, 2002). Unter den verschiedenen Assemblierungsmodellen für bakterielle Fimbrien und Pili ist der Chaperon-Usher-Pathway Gram-negativer Bakterien der bestuntersuchteste und soll in Folge anhand des Typ 1-Pilus, dessen Assemblierung analog zu der des Pap-Pilus erfolgt, erläutert werden.

Wie aus Abb. I.3 hervorgeht, setzt sich der Pilus aus einem festen, helikalen Filament und einem dünnen, flexiblen Fibrillum zusammen, an dessen Spitze sich das Adhäsins FimH befindet. Der Pilus besteht dabei aus mehreren verschiedenen Proteinen, die in einer charakteristischen Art und Weise angeordnet sind. All diese Protein-Untereinheiten werden durch die innere Membran in das Periplasma sekretiert, wo sie von einem Chaperon („Anstands-dame“) gebunden werden. Bei diesem Chaperon handelt es sich um FimC (bei Pap-Pili PapD), einem 25 kDa-Protein, das aus zwei Immunglobulin-ähnlichen Domänen aufgebaut ist. Durch die Bindung der Pilus-Untereinheiten verhindert das Chaperon nicht nur ihre vorzeitige Polymerisierung bzw. ihren Abbau, sondern verhilft den Proteinen auch zu einer korrekten Faltung und Stabilisierung. Die Komplexe aus Chaperon und Untereinheit werden zu FimD, einem Usher („Platzanweiser“) geleitet. Dieses Protein bildet eine zentrale Pore in der äußeren Membran und erlaubt dem entstehenden Pilus den Durchtritt an die Zelloberfläche. Ferner

katalysiert der Usher den spontanen Zusammenbau der Piline in der entsprechenden Reihenfolge (Allen *et al.*, 2012). Dabei wird die Pilus-Synthese, die ohne zusätzliche Energie in Form von ATP oder Ionengradienten abläuft, erst durch Bindung des FimC:FimH-Komplexes an den Usher initiiert (Waksman & Hultgren, 2009), wodurch sichergestellt ist, dass sich das Adhäsins an der Spitze befindet. Der Pilus wächst anschließend durch die an der Basis neu hinzugefügten Untereinheiten, wobei das Chaperon selbst kein Bestandteil des Zellansatzes wird, sondern freigesetzt wird und den neu sekretierten Pilus-Untereinheiten zur Verfügung steht.

Die Gene aller Proteine, die am Aufbau der Typ 1- bzw. Pap-Pili beteiligt sind, liegen geclustert vor und werden gemeinsam transkribiert (Sauer *et al.*, 2004).

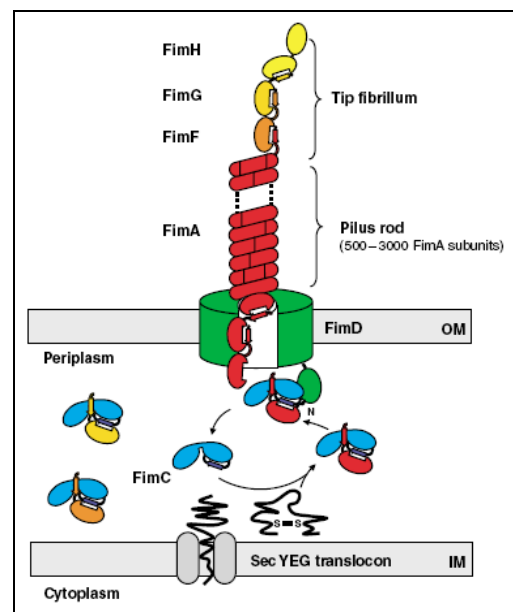


Abb. I.3: Assemblierung des Typ 1-Pilus von *E. coli* entsprechend des Chaperon-Usher-Pathways (aus Nishiyama *et al.*, 2005).

Von archaeellen Fimbrien wurde erstmals im Jahr 1979 berichtet (Doddema *et al.*, 1979), wobei der Begriff „Fimbrium“ lediglich aufgrund des im Vergleich zum Flagellum geringeren Durchmessers von 5 nm gewählt wurde. Bei diesen Fimbrien handelte es sich um die Zellanhänge von *Methanothermobacter thermoautotrophicus*, der zu diesem Zeitpunkt noch als *Methanobacterium thermoautotrophicum* bezeichnet wurde (Zeikus & Wolfe, 1972). Die Gattung *Methanothermobacter* wurde erst im Jahr 2000 in Folge von 16S rRNA-Analysen zur Klärung der Verwandtschaftsbeziehungen innerhalb der Gattung *Methanobacterium* neu geschaffen (Wasserfallen *et al.*, 2000).

M. thermoautotrophicus DeltaH wurde 1971 in Illinois (USA) aus Klärschlamm isoliert. Der thermophile Organismus (T_{opt} 65°C) bevorzugt einen neutralen pH-Wert von 7,2 bis 7,6 und wächst strikt anaerob. Zur Herstellung von Methan nutzt er ausschließlich Wasserstoff als Reduktionsmittel und Kohlenstoffdioxid als alleinige Kohlenstoffquelle (Zeikus & Wolfe, 1972). Die stäbchenförmige Morphologie der Zellen wird durch eine starre, 16,5 nm dicke Schicht aus Pseudomurein erhalten (Zeikus & Wolfe, 1973).

Die bis zu 10 µm langen Fimbrien von *M. thermoautotrophicus* sind vor allem an den Zellpolen lokalisiert und werden vorwiegend in der stationären Wachstumsphase gebildet. Eine viel höhere Anzahl an Fimbrien findet sich zudem an adhären wachsenden Organismen (Abb. I.4), wobei die Fimbrien in diesem Fall ein Netzwerk bilden, das sowohl die Zellen

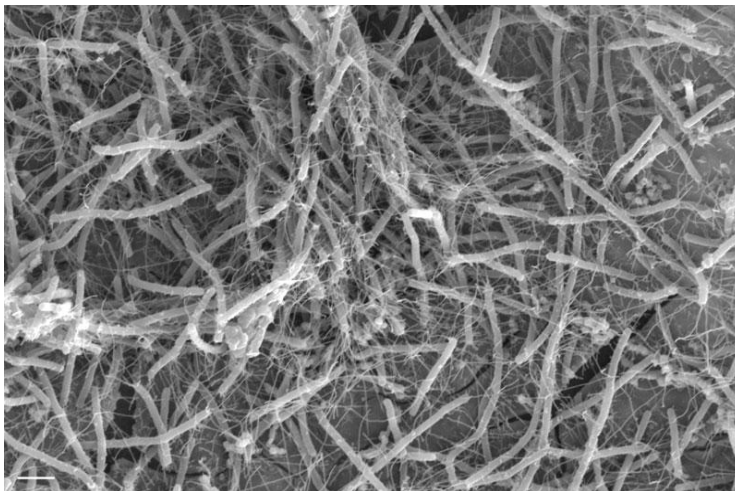


Abb. I.4: *M. thermoautotrophicus* gewachsen auf Nickel-Grids. Balken: 2 µm (aus Thoma *et al.*, 2008).

untereinander als auch mit der Aufwuchsoberfläche verbindet (Thoma *et al.*, 2008). Als Aufwuchsoberflächen kann *M. thermoautotrophicus* eine Vielzahl verschiedenartiger Materialien nutzen, wie z.B. Aluminium, Glaskohle, Silicium-Wafer, Deckgläschen, und kohlebeschichtete Gold-Grids (Thoma, 2005; Frank, 2006; Janker, 2008).

Diese Ergebnisse, sowie die Tatsache, dass die Zugabe eines spezifischen Antikörpers die Ablösung der adhären Zellen bewirkt, machten deutlich, dass die Fimbrien des nicht motilen *M. thermoautotrophicus*, ähnlich wie bakterielle Fimbrien bzw. Pili, als Adhäsionsstrukturen fungieren (Thoma *et al.*, 2008).

Als Hauptbestandteil der Fimbrien von *M. thermoautotrophicus* konnte – mit einem Anteil von über 95 % (Prof. Wirth, persönliche Mitteilung) – das Protein Mth60 identifiziert werden.

Mth60 wird posttranslational durch Glykosylierung modifiziert und zeichnet sich nach Abspaltung des 33 Aminosäure langen, N-terminalen Signalpeptids im SDS-Gel durch eine Wanderstrecke entsprechend der eines 16 kDa Proteins aus (Thoma *et al.*, 2008).

Das dem Hauptfimbrien zugrunde liegende Gen *mth60* scheint einzigartig zu sein. So konnten im Rahmen von Datenbank-Recherchen lediglich signifikante Homologien zu zwei anderen, hypothetischen Genen aus *M. thermoautotrophicus* (*mth382* und *mth383*) gefunden werden. Den entsprechenden Proteinen werden eine N-terminale Transmembranhelix (Mth382) bzw. ein Signalpeptid (Mth383) vorhergesagt, weswegen angenommen wird, dass diese beiden Proteine in irgendeiner Weise an der Synthesemaschinerie der Mth60-Fimbrien beteiligt sind (Thoma *et al.*, 2008).

Über den möglichen Assemblierungsmechanismus archaeeeller Fimbrien sind noch keinerlei Daten bekannt. Für die Mth60-Fimbrien konnte allerdings über Reverse-Transkriptions-PCR (RT-PCR) und Northern Blots gezeigt werden, dass das Strukturgen *mth60* mit benachbarten Genen co-transkribiert wird: So bildet *mth60* eine Transkriptionseinheit mit *mth59* und *mth58*, ein weiteres Operon umfasst die beiden Gene *mth61* und *mth60*. Abb. I.5 zeigt ein Schema der Co-Transkripte, wobei die Länge der dargestellten Gene und intergenen Regionen auf Ergebnissen basiert, die durch Nachsequenzierung erhalten wurden (Sarbu, 2009). Diese Sequenzen weichen von den in der Datenbank NCBI hinterlegten geringfügig ab und sind im Anhang beigefügt (siehe VI.2).

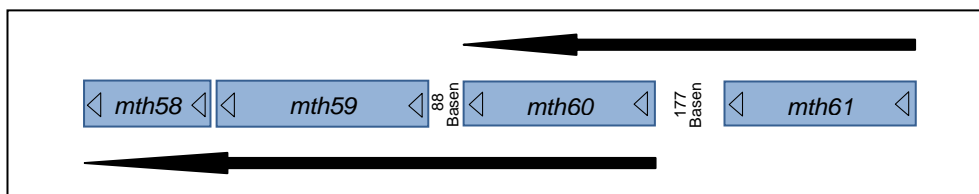


Abb. I.5: Schematische Darstellung der über RT-PCR und Northern Blot ermittelten Co-Transkripte *mth61/mth60* sowie *mth60/mth59/mth58*. Zwischen den kodierenden Sequenzen ist die Länge der intergenen Regionen gekennzeichnet. Der Abstand zwischen *mth59* und *mth58* beträgt 6 Basen. ◀ zeigt die Transkriptionsrichtung der kodierenden Bereiche an.

Durch den semiquantitativen Charakter des Northern Blottings zeigte sich zudem, dass *M. thermoautotrophicus* eine deutlich erhöhte Menge an *mth60*-mRNA im Vergleich zu allen anderen untersuchten (Co-)Transkripten enthält (Sarbu, 2009).

Aufgrund der Co-Transkriptionen ist davon auszugehen, dass Mth61, Mth59 und Mth58 an der Assemblierung der Mth60-Fimbrien beteiligt sind. Während bioinformatische Analysen keinerlei Homologien zu Mth58 und Mth61 aufdecken konnten, zeigte Mth59 signifikante Ähnlichkeiten zu bakteriellen Chaperonen (Sarbu, 2009). Eines davon ist das Chaperon Caf1M aus *Yersinia pestis* (e-value $3,7 \times 10^{-18}$, Score 93,84), einem zu PapD bzw. FimC homologen Protein (Du *et al.*, 2002), das an der Oberflächen-Exposition des Antigens F1 im Rahmen eines Chaperon-Usher-Pathways beteiligt ist (Zavialov *et al.*, 2002).

Das Ziel dieser Arbeit lag darin, weitere Erkenntnisse über die Mth60-Fimbrien von *M. thermoautotrophicus* zu gewinnen. Zu diesem Zweck war es zunächst wichtig, eine Methode zu etablieren, die die Anreicherung größerer Mengen dieser Zellanhänge ermöglichte. Von Interesse war dabei nicht nur die Identifizierung eventuell vorhandener Nebenfimbrine, sondern vor allem auch die Generierung von Antikörpern. Diese Antikörper sollten unter anderem dazu eingesetzt werden, um die Verwandtschaft zwischen den Mth60-Fimbrien und den Fimbrien von *Methanothermobacter marburgensis* bzw. *Methanothermus fervidus* zu untersuchen.

Um einen Einblick in den möglichen Assemblierungsmechanismus der Mth60-Fimbrien zu erhalten, sollte in erster Linie die Funktion des vermeintlichen Chaperons Mth59 analysiert werden. Dazu sollte über Co-Immunpräzipitation ermittelt werden, ob Mth59 mit dem Hauptfimbrin Mth60 interagieren kann. Zu diesem Zweck mussten Antikörper gegen das rekombinant erzeugte Mth59 generiert werden. Diese Antikörper sollten zusätzlich in Immunlokalisationsexperimenten eingesetzt werden und dazu beitragen, die zelluläre Lage von Mth59 zu klären. Auf diese Weise sollte ein weiterer, wenn auch indirekter Hinweis auf die Funktion des Proteins erhalten werden. Ferner war es von großer Bedeutung, eine Möglichkeit zu finden, das Hauptfimbrin Mth60, welches sich in der Vergangenheit als toxisch für *E. coli* erwiesen hatte, rekombinant herzustellen. Dieses Protein sollte in Polymerisationsstudien eingesetzt werden und seine Fähigkeit, sich selbstständig zu Fimbrien zusammenzulagern, unter verschiedenen Bedingungen untersucht werden. Des Weiteren sollte überprüft werden, ob sich die hypothetischen Proteine Mth58 und Mth61 rekombinant in *E. coli* erzeugen lassen und diese demnach auch für Analysen bezüglich ihrer Funktion und Lokalisation in *M. thermoautotrophicus* herangezogen werden können.

Schlussendlich sollten die bereits aus den Northern Blots entnommenen, unterschiedlichen (Co-)Transkriptmengen innerhalb der beiden Operons *mth61/mth60* und *mth60/mth59/mth58* über quantitative RT-PCR genauer bestimmt werden.

II Material und Methoden

1 Bezugsquellen

1.1 Chemikalien und Biochemikalien

Alle verwendeten Chemikalien, die nicht in nachfolgender Tabelle aufgelistet sind, wurden von VWR International GmbH, Darmstadt, bezogen. Alle für die Medienherstellung benötigten Gase stammten von der Firma Linde Technische Gase, Nürnberg.

Chemikalie	Bezugsquelle
1-Hexadecen	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Buchs (CH)
3-Amino-9-Ethylcarbazol	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Acrylamid/Bisacrylamid (37,5:1), 30 %	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Agar	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg
Agarose	Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen
Ammoniumnickelsulfat x 6 H ₂ O	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Buchs (CH)
Ampicillin, Na-Salz	MP Biomedicals GmbH, Eschwege
APS (Ammoniumpersulfat)	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg
Bromphenolblau, Na-Salz	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg
BSA (Rinderserumalbumin)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Calciumchlorid x 2 H ₂ O	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Carbenicillin	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Cäsiumchlorid	Biomol GmbH, Hamburg
Chloramphenicol	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg
Coomassie Brilliant Blue G250	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg
DDSA (Dodecenylnbernsteinsäureanhydrid)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Buchs (CH)
DEPC (Diethylpyrocarbonat)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
DMP-30 (Tridimethylaminomethylphenol)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Buchs (CH)
Epoxy-Einbettungsmittel	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Ethanol p.a.	Mallinckrodt Baker, Deventer (NL)
Ethidiumbromid	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg
Glutardialdehyd, EM-grade (25 %)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Glycerin	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
H ₂ O, nukleasefrei, steril	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Hefeextrakt	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg
HEPES (Hydroxyethylpiperazin-Ethansulfonsäure)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Imidazol	Biomol GmbH, Hamburg
IPTG (Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid)	Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen
Magermilchpulver	Milchwerke Regensburg eG, Regensburg
Methanol p.a.	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
MNA (Methylnadic Anhydrid)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Buchs (CH)
Na ₂ -EDTA (Ethylendiamintetraessigsäure)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen

Chemikalie	Bezugsquelle
Natriumthiosulfat	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Nickelamoniumsulfat x 6 H ₂ O	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
PEG (Polyethylenglycol) 6000	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Pepton	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg
Phenol	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol (25:24:1)	Biomol GmbH, Hamburg
PMSF (Phenylmethylsulfonylfluorid)	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg
Ponceau S	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Resazurin, Na-Salz	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg
RNase AWAY [®]	Molecular BioProducts Inc., San Diego (USA)
Roti [®] -Nanoquant	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Silbernitrat	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
TEMED (N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Tricin	MP Biomedicals GmbH, Eschwege
Tris (Tris(hydroxymethyl)aminomethan)	USB Europe GmbH, Staufeu
Triton X-100	MP Biomedicals GmbH, Eschwege
Trizol	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Tween 20	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg
Uranylacetat	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen

1.2 Reaktionskits und Chromatographiesäulen

Reaktionskit	Bezugsquelle
High Pure RNA Isolation Kit	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
peqGOLD Plasmid Miniprep Kit I	PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen
Phusion [®] High Fidelity PCR Kit	New England Biolabs GmbH, Frankfurt
Pierce [®] Chicken IgY Purification Kit	Thermo Fisher Scientific, Dreieich
Pierce [®] Direct IP Kit	Thermo Fisher Scientific, Dreieich
QIAquick PCR Purification Kit	Qiagen GmbH, Hilden
SensiMix [™] SYBR No-ROX Kit	Bioline GmbH, Luckenwalde
Thrombin CleanCleave [™] Kit	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Transcriptor High Fidelity cDNA Synthesis Kit	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim

Chromatographiesäule	Bezugsquelle
HiTrap [®] NHS-activated HP, 5 ml	GE Healthcare, Uppsala (SWE)
HiTrap [®] Protein G Säule, 1 ml	GE Healthcare, Uppsala (SWE)
Protino [®] Ni-TED 2000 Packed Columns	Macherey-Nagel GmbH, Dören
Superdex 75 10/300 GL Säule	GE Healthcare, Uppsala (SWE)

1.3 Enzyme

Enzym	Bezugsquelle
Chymotrypsin (sequencing grade)	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
DNase, RNase-frei	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Lysozym	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Proteinase K	VWR International GmbH, Darmstadt
Restriktionsenzyme (und zugehörige Puffer)	New Englad Biolabs GmbH, Frankfurt
RNase, DNase-frei	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
RNase A	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
T4 DNA-Ligase (und zugehöriger Puffer)	New Englad Biolabs GmbH, Frankfurt
Trypsin (sequencing grade)	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
V8-Endoproteinase Glu-C (sequencing grade)	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim

1.4 Molekularmassenstandards und Ladepuffer

Molekularmassenstandard/Ladepuffer	Bezugsquelle
2x RNA Auftragspuffer	Thermo Fisher Scientific, Dreieich
6x DNA Ladepuffer	PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen
PageRuler™ Prestained Protein Ladder	Fermentas GmbH, St. Leon-Rot
PageRuler™ Unstained Protein Ladder	Thermo Fisher Scientific, Dreieich
Quick-Load 1 kb DNA-Ladder	New Englad Biolabs GmbH, Frankfurt
Quick-Load 100 bp DNA-Ladder	New Englad Biolabs GmbH, Frankfurt
RiboRuler™ RNA-Ladder, High Range	Thermo Fisher Scientific, Dreieich

1.5 Vektor und Oligonukleotide

Der verwendete Vektor pET-14b wurde von Novagen Inc., Madison (USA), bezogen.

Alle in dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotide wurden von der Firma Metabion GmbH, Martinsried, synthetisiert. Sie wurden in einer Konzentration von 100 pmol/μl geliefert. Die Oligonukleotide wurden mit dem Programm Invitrogen OligoPerfect™ Designer (Webseite der Firma Invitrogen) berechnet. Ihre Qualität konnte mit dem Programm Oligo Analyzer (Integrated DNA Technologies, <http://eu.idtdna.com>) geprüft werden.

Primerbezeichnung	Sequenz (5' → 3')	Verwendung
mth58_F_NdeI_AK	AGCATATGACAGGGGCCAT	GK
mth58_R_XhoI_AK	CGCTCGAGTTACTTTTTCCTCT	GK
mth59_F_NdeI	GGCATATGAAAGTCAGACACTTAACA	GK
mth59_R_BamHI	GAGGATCCCTAGACTGTACCTGTATT	GK
mth61_F_NdeI	GGCATATGAGGACGACAGTTATTT	GK
mth61_R_BamHI	TAGGATCCTCAGTTGCTGTG	GK
pET14b_61-58_BamHI_R	ATCGGATCCTTACTTTTTCCTCTC	GK
pET14b_61-58_NdeI_F	TATCATATGAGGACGACAGTTATTTCC	GK

Primerbezeichnung	Sequenz (5' → 3')	Verwendung
pET14b_F	GATATACCATGGGCAGCAGC	Seq
pET14b_R	TTATTGCTCAGCGGTGGC	Seq
qPCR_mth58_F	AGCTACACACTGGTTGAGACATG	qRT-PCR
qPCR_mth58_R	AGGATTATCAGCCATGCAGG	qRT-PCR
qPCR_mth59_F	AGGAAGATAAGATTCACGGTCAAC	qRT-PCR
qPCR_mth59_R	ATATATGGGTACCACCAGTTCGAC	qRT-PCR
qPCR_mth59-58_F	CCGGTAGGTTACCTACAACT	qRT-PCR
qPCR_mth59-58_R	TCCATGTCTCAACCAGTGTGTAG	qRT-PCR
qPCR_mth60_F	ATGGGAGTAATCCCGCTTATG	qRT-PCR
qPCR_mth60_R	CCGAAGTTAACATTCGGTACAAC	qRT-PCR
qPCR_mth60-59_F	TACACAGCAGTGAAGCATAACTCA	qRT-PCR
qPCR_mth60-59_R	AGGGCTGTTAAGTGTCTGACTTTC	qRT-PCR
qPCR_mth61_F	CTGATGGCATCGAAAGGAG	qRT-PCR
qPCR_mth61_R	AATTTGAGGCTGGATAGGGG	qRT-PCR
qPCR_mth61-60_F	ACACTCATCTACACAGCAACCTG	qRT-PCR
qPCR_mth61-60_R	AACTTTTCCCTCATATTGATCACC	qRT-PCR

GK: Genklonierung, die Erkennungsstelle des Restriktionsenzym ist in der Sequenz unterstrichen; Seq: Sequenzierung; qRT-PCR: quantitative Reverse-Transkriptions-PCR; F: Vorwärtsprimer; R: Rückwärtsprimer.

1.6 Antikörper

Bei allen primären Antikörpern, die in Zusammenarbeit mit Davids Biotechnologie, Regensburg, hergestellt wurden, handelt es sich um polyklonale Antikörper. Lediglich die kommerziell erhältlichen anti-polyHistidin Antikörper sind monoklonalen Ursprungs.

Primäre Antikörper	Antigen	Literatur	Hersteller
chicken anti-Mth60-Fimbrien	Mth60-Fimbrien von <i>M. thermoautotrophicus</i>	diese Arbeit	Davids Biotechnologie
rabbit anti-Mth59	rekombinantes Mth59	diese Arbeit	Davids Biotechnologie
rabbit anti-Mth60-Fimbrien	Mth60-Fimbrien von <i>M. thermoautotrophicus</i>	diese Arbeit	Davids Biotechnologie
mouse anti-polyHistidin	Polyhistidin	-/-	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen

Sekundäre Antikörper	Hersteller
goat-anti-mouse IgG, Peroxidase-gekoppelt	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
goat-anti-rabbit IgG, 6 nm Gold	Aurion Co., Wageningen (NL)
goat-anti-rabbit IgG, ultra-small Gold	Aurion Co., Wageningen (NL)
goat-anti-rabbit IgG, Peroxidase-gekoppelt	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
rabbit-anti-chicken IgG, Peroxidase-gekoppelt	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen

1.7 Verbrauchsmaterialien

Verbrauchsmaterialien	Bezugsquelle
Aluminiumkappen (Ø 20 mm, 10 mm Loch)	WICOM GmbH, Heppenheim
Cellulosekapillaren	Gambro Hospal GmbH, Planegg-Martinsried
Deckgläser, 20 x 20 mm	Paul Marienfeld GmbH & Co. KG, Lauda-Königshofen
Dialyseschläuche ZelluTrans	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
DryEase [®] Mini Cellophane	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Einmalkanülen	Terumo Europe N.V., Leuven (B)
Einmalskalpell	VWR International GmbH, Darmstadt
Einmalspritzen 1 ml	Terumo Europe N.V., Leuven (B)
Einmalspritzen 5 ml	B. Braun Melsungen AG, Melsungen
Whatman [®] 3MM Chromatographiepapier	Whatman Biometra GmbH, Göttingen
Glaskohle	HTW GmbH, Thierhaupten
Glaskügelchen (Ø 0,17-0,18 mm)	B. Braun Melsungen AG, Melsungen
Goldträger für Hochdruckgefrieranlage	Leica Microsystems GmbH, Wetzlar
Grids für TEM (Gold; Nickel; Kupfer)	Plano GmbH, Wetzlar
Gummistopfen für Serumflaschen	Deutsch & Neumann GmbH, Berlin
Immersionsöl	Carl Zeiss AG, Oberkochen
Kondensatorküvetten	Biorad Laboratories GmbH, München
Objektträger	Menzel GmbH & Co. KG, Braunschweig
Parafilm [®] M	Bemis Company Inc., Neenah (USA)
Pasteurpipetten	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
PCR-Reaktionsgefäße (0,2 ml)	VWR International GmbH, Darmstadt
pH-Indikatorstäbchen	VWR International GmbH, Darmstadt
Pipettenspitzen	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
Pipettenspitzen mit Filter, Biosphere [®]	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
Plastikpetrischalen	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
Protein LoBind Tubes (1,5 ml; 2,0 ml)	Eppendorf AG, Hamburg
PVDF-Membran „Immobilon-P ^{SQ} “	Millipore GmbH, Schwalbach
Reaktionsgefäße (0,5 ml; 1,5 ml; 2,0 ml)	Eppendorf AG, Hamburg
Reaktionsgefäße (1,5 ml) RNase-frei	PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen
Rundfilter (Ø 110 mm)	Schleicher & Schuell GmbH, Dassel
Schraubdeckelgefäße für FastPrep-24	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
Schraubrohre („Falcon Tube TM “)	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
Sterilfilter (0,22 µm Porenweite)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Sterilfilter (0,45 µm Porenweite)	VWR International GmbH, Darmstadt
Strip Tubes and Caps (0,1 ml)	Qiagen GmbH, Hilden
Teflonhalter für Grids	Mechanische Werkstatt, Biologie, Universität Regensburg
Ultra-Clear TM Centrifuge Tubes, 4 ml	Beckman Coulter GmbH, Krefeld

1.8 Glaswaren

Alle verwendeten Glaswaren stammten von der Firma Schott Glas aus Mainz. Ausnahmen bildeten die für die anaerobe Kultivierung benötigten 100 ml-Serumflaschen aus Natronkalksilikatglas (Pharmapack Stute, Rheinbreitenbach) sowie die 1 Liter Druckflaschen aus Bor-silikatglas (Müller & Krempel, Bülach, CH). Glaskügelchen, die für den Zellaufschluss mit anschließender RNA-Isolierung verwendet wurden, sind unter II.1.7 angeführt.

1.9 Geräte

Geräte	Bezugsquelle
ÄKTA™	GE Healthcare, Uppsala (SWE)
Anaerobenkammer	COY Lab. Products Inc., Ann Arbor (USA)
Autoklav (SANOclav)	Adolf Wolf SANOclav, Bad Überkingen
Cycler MJ Mini Personal Thermal	Biorad Laboratories GmbH, München
Cycler Rotor-Gene 6000	Corbett Research, Sydney (AUS)
Diamantmesser Histo	Diatome AG, Biel (CH)
Dispensette®	Brand GmbH & Co. KG, Wertheim
Elektroporationsapparatur GenePulser® II	Biorad Laboratories GmbH, München
Fermenter, 100 l	Bioengineering AG, Wald (CH)
Fräse Leica EM Trim2	Leica Microsystems GmbH, Wetzlar
Gefriersubstitutionsanlage EM AFS2 und zugehöriger Präparatehalter	Leica Microsystems GmbH, Wetzlar
Geldokumentationsanlage BioDoc-It™	Ultra-Violet Products Ltd., Cambridge (UK)
Gelkammer für Agarosegele (11 x 12 cm)	Mechanische Werkstatt, Biologie, Universität Regensburg
Geltrocknungssystem DryEase™ Mini	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Hochdruckgefrieranlage EM PACT2	Leica Microsystems GmbH, Wetzlar
Homogenisator FastPrep®-24	MP Biomedicals German GmbH, Eschwege
Inkubaor Heraeus Typ T6 und B12	Heraeus Instruments GmbH, Hanau
Inkubator Memmert Typ ULE 700	Memmert, Schwabach
Kamera DP21	Olympus Europa GmbH, Hamburg
Kamera Slow-Scan-CCD	TVIPS-Tietz, Gauting
Lichtmikroskop Nikon Labophot 2	Nikon GmbH, Düsseldorf
Lichtmikroskop Olympus CX31	Olympus Europa GmbH, Hamburg
Magnetrührer MR3002	Heidolph Elektro GmbH & Co. KG, Kelheim
Mikrowelle Privileg 9023 E	Quelle GmbH, Fürth
Minigel-Twin-Apparatur	(Whatman) Biometra GmbH, Göttingen
PCR Chamber	BÄRO GmbH & Co. KG, Leichlingen
pH-Meter	WTW GmbH, Weilheim
Plasma Cleaner/Sterilizer PDC-3XG	Harrick Plasma, Ithaca (USA)
Rollordrum™, Model TC7	New Brunswick Scientific Co., Edison (USA)
Schütteltisch HS 250 basic	IKA Labortechnik, Staufen

Geräte	Bezugsquelle
Spannungsquelle für die Elektrophorese, ST305	Invitrogen GmbH (GIBCO), Karlsruhe
Spektralphotometer Genesys 5	Milton Roy Europe, Pont Saint Pierre (F)
Spektralphotometer NanoDrop ND-1000	PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen
Sterilbank Microflow Biological Safety Cabinet	Nunc GmbH & Co. KG, Wiesbaden
Thermomixer compact 5450	Eppendorf AG, Hamburg
Thoma-Zählkammer	Brand GmbH & Co. KG, Wertheim
Trans-Blot® SD Semi Dry Transfer Cell	Biorad Laboratories GmbH, München
Transmissionselektronenmikroskop Philips CM12	FEI Co., Eindhoven (NL)
Über-Kopf-Schüttler Intelli-Mixer RM-2L	LTF Labortechnik GmbH, Wasserburg
Ultramikrotom Leica EM UC7	Leica Microsystems GmbH, Wetzlar
Ultramikrotom Ultracut E	Leica Microsystems GmbH, Wetzlar
Ultraschall Desintegrator Sonifier 250	Branson Ultrasonic Corp., Danbury (USA)
UV Chamber GS Genelinker	Biorad Laboratories GmbH, München
Vortex Genie 2	Scientific Industries Inc., Bohemia (USA)
Waage MC1-Analytic AC 120 S	Sartorius AG, Göttingen
Waage Precision Standard TP400D	Ohaus Corp., Cambridge (UK)
Wasserbad	Memmert GmbH & Co. KG, Schwabach
Wasserbadschüttler Gyrotory, Model G76	New Brunswick Scientific Co., Edison (USA)
Zentrifugen	
Biofuge 13 (Rotor 3757)	Heraeus Instruments GmbH, Hanau
Centrifuge 5402 (Rotor F45-18-11)	Eppendorf AG, Hamburg
Durchlaufzentrifuge Heraeus Contifuge Stratos	Heraeus Instruments GmbH, Hanau
Durchlaufzentrifuge Padberg CEPA Z41-G	Carl Padberg Zentrifugenbau GmbH, Lahr
Labofuge GL (Rotor 2150)	Heraeus Instruments GmbH, Hanau
Sorvall® RC 5C Plus (Rotoren: SS-34, GSA)	Thermo Fisher Scientific, Dreieich
Ultrazentrifuge Beckman Optima™ LE-80K (Rotoren: SW 60Ti, 70Ti)	Beckman Coulter GmbH, Krefeld

1.10 Organismen

Alle verwendeten methanogenen Archaeen stammen aus der Bakterienbank Regensburg. Die *E. coli*-Stämme waren in der Bakterienbank des Labors Prof. Wirth hinterlegt.

Methanogene Archaeen	Stamm	Herkunft	Vertrieb	Literatur
<i>M. thermoautotrophicus</i>	DeltaH	Illinois (USA)	DSM 1053	Zeikus & Wolfe, 1972
<i>M. thermoautotrophicus</i>	AG5	Neapel (I)	-/-	-/-
<i>M. marburgensis</i>	-/-	Marburg	DSM 2133	Fuchs <i>et al.</i> , 1978
<i>Methanothermus fervidus</i>	V24S	Kerlingarfjöll (Is)	DSM 2088	Stetter <i>et al.</i> , 1981

M.: *Methanothermobacter*

<i>Escherichia coli</i>	Genotyp	Vertrieb
BL21 Star(DE3) Expressionsstamm	F ⁻ <i>ompT hsdS_B (r_B⁻m_B⁻) gal dcm rne131</i> (DE3)	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
BL21(DE3)pLysS Expressionsstamm	F ⁻ <i>ompT hsdS_B (r_B⁻m_B⁻) gal dcm λ</i> (DE3) pLysS (Cam ^R)	Novagen, Madison (USA)
DH5α Klonierungsstamm	F ⁻ ϕ 80/ <i>lacZΔM15 Δ(lacZYA-argF)U169 recA1 endA1 hsdR17(r_k⁻, m_k⁺) phoA supE44 thi-1 gyrA96 relA1 λ⁻</i>	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
ER2566 Expressionsstamm	<i>fhuA2 lacZ::T7 gene1 [lon] ompT gal sulA11 R(mcr-73::miniTn10--Tet^S)2 [dcm] R(zgb-210::Tn10--Tet^S) endA1 Δ(mcrC-mrr)114::IS10</i>	New England Biolabs GmbH, Frankfurt
Rosetta(DE3)pLysS Expressionsstamm	F ⁻ <i>ompT hsdS_B (r_B⁻m_B⁻) gal dcm</i> (DE3) pLysSRARE (Cam ^R)	Novagen, Madison (USA)
BL21-CodonPlus- (DE3)-RIPL Expressionsstamm	F ⁻ <i>ompT hsdS (r_B⁻m_B⁻) dcm⁺Tet^r gal λ</i> (DE3) <i>endA Hte [argU proL Cam^r] [argU ileY leuW Strep/Spec^r]</i>	Stratagene, La Jolla (USA)

2 Kulturmedien und Anzucht der Mikroorganismen

2.1 MS-Medium (Balch et al., 1979), modifiziert

M. thermoautotrophicus, *M. marburgensis* und *M. fervidus* wurden unter strikt anaeroben Bedingungen in MS-Medium kultiviert.

2.1.1 Zusammensetzung des MS-Kulturmediums

Substanz bzw. Lösung	Menge
NaCl	0,45 g
NaHCO ₃	6,00 g
MgSO ₄ x 7 H ₂ O	0,10 g
KH ₂ PO ₄	0,23 g
K ₂ HPO ₄	0,17 g
(NH ₄) ₂ SO ₄	0,23 g
CaCl ₂ x 2 H ₂ O	0,06 g
(NH ₄) ₂ Ni(SO ₄) ₂ (0,2 %ig, w/v)	1,0 ml
FeSO ₄ x 7 H ₂ O (0,2 %ig, w/v)	1,0 ml
Wolfe's Mineralien 10x (pH 1,0; ohne Titriplex)	1,0 ml
Wolfe's Vitamine 10x	1,0 ml
Resazurin (0,1 %ig, w/v)	1,0 ml
Na ₂ S x 3 H ₂ O	0,25 g
H ₂ O _{millipore}	ad 1000 ml

Der pH wurde mit ca. 0,6 ml 50 % (v/v) H₂SO₄ auf 7,0 eingestellt.

Zum Resuspendieren bzw. Waschen von Zellen wurde ein aerober MS-Waschpuffer verwendet. Dieser war in seiner Zusammensetzung identisch mit dem MS-Kulturmedium, enthielt jedoch weder Natriumsulfid noch Resazurin.

Mineralienelexier nach Wolfe (Balch *et al.*, 1979), modifiziert, 10x (pH 1,0; ohne Titriplex)

Substanz	Menge
NaCl	10,0 g
MgSO ₄ x 7 H ₂ O	30,0 g
MnSO ₄ x H ₂ O	5,00 g
FeSO ₄ x 7 H ₂ O	1,00 g
CoCl ₂ x 6 H ₂ O	1,80 g
CaCl ₂ x 2 H ₂ O	1,00 g
ZnSO ₄ x 7 H ₂ O	1,80 g
CuSO ₄ x 5 H ₂ O	0,10 g
KAl(SO ₄) ₂ x 12 H ₂ O	0,18 g
H ₃ BO ₃	0,10 g
Na ₂ MoO ₄ x 2 H ₂ O	0,10 g
(NH ₄) ₂ Ni(SO ₄) ₂ x 6 H ₂ O	2,80 g
Na ₂ WO ₄ x 2 H ₂ O	0,10 g
Na ₂ SeO ₄	0,10 g
H ₂ O _{millipore}	ad 1000 ml

Der pH wurde mit 1M H₂SO₄ bereits vor dem Lösen der Mineralien auf 1,0 eingestellt.

Vitaminlösung nach Wolfe (Balch *et al.*, 1979), modifiziert, 10x

Substanz	Menge
Biotin	20 mg
Folsäure	20 mg
Pyridoxamindihydrochlorid (Vit. B ₆)	100 mg
Thiamindihydrochlorid (Vit. B ₁)	50 mg
Riboflavin (Vit. B ₂)	50 mg
Nikotinsäure	50 mg
DL-Calciumpantheonat	50 mg
Cyanocobalmin (Vit. B ₁₂)	5 mg
p-Aminobenzoessäure (PABA)	50 mg
Liponsäure	50 mg
H ₂ O _{millipore}	ad 1000 ml

Die Mineralien- und Vitaminlösung wurden sterilfiltriert und lichtgeschützt bei 8°C gelagert.

2.1.2 Herstellung im Labormaßstab

Alle Medienbestandteile, mit Ausnahme des Natriumsulfids (Na_2S), wurden in $\text{H}_2\text{O}_{\text{millipore}}$ gelöst und in eine 1 l Duranglasflasche gefüllt. Die Flasche wurde mit einem Gummistopfen und einem durchbohrten Schraubdeckel verschlossen und das Medium an der Gasstation für etwa 30 min mit N_2 bei 0,5 bar Überdruck unter Druckausgleich durchgast. Dadurch sollte der vorhandene Sauerstoff weitestgehend ausgetrieben werden. Restsauerstoff wurde durch Zuspritzen des in 1 ml $\text{H}_2\text{O}_{\text{millipore}}$ gelösten Natriumsulfids vollständig reduziert, was am Farbumschlag des Mediums von blau über rosa nach farblos verfolgt werden konnte. Der pH-Wert wurde durch Zugabe von etwa 0,6 ml 50 % (v/v) H_2SO_4 auf 7,0 eingestellt. Zur Portionierung wurde das Medium in die Anaerobenkammer eingeschleust.

Für die Anzucht in kleinen Volumina wurden 120 ml Serumflaschen mithilfe einer Dispensette® zu je 20 ml befüllt und mit Gummistopfen verschlossen. Nach dem Ausschleusen aus der Kammer wurden die Stopfen mit Aluminiumkappen gesichert. Zur Kultivierung in 1 l Druckflaschen wurden diese in der Anaerobenkammer mit 250 ml mit MS-Medium befüllt und anschließend mit einem Gummistopfen und Metallschraubdeckel versehen.

Zum Schluss wurde das Formiergas (N_2/H_2 , 95:5, v/v) der Anaerobenkammer gegen ein H_2/CO_2 -Gemisch (80:20, v/v) ausgetauscht. Dazu wurden die Serum- bzw. Druckflaschen an der Gasstation dreimal aufeinander folgend evakuiert und mit einem Überdruck von 1,5 bar begast. Die Sterilisation der Medien erfolgte wie unter II.3 beschrieben.

2.1.3 Großtechnische Herstellung im Fermenter

Mit dem Ziel der Fimbrien-Isolierung wurde *M. thermoautotrophicus* in einem 100 l Fermenter gezüchtet. Hierzu wurden bis auf Resazurin, Natriumsulfid und Schwefelsäure alle Bestandteile des MS-Mediums im Fermenter unter Rühren in $\text{H}_2\text{O}_{\text{millipore}}$ gelöst, anaerob durchgast und 40 min bei 121°C autoklaviert. Die Na_2S -Lösung (25 g in ca. 100 ml $\text{H}_2\text{O}_{\text{millipore}}$) und die 50 %ige (v/v) H_2SO_4 wurden separat sterilisiert (siehe II.3). Nach Abkühlen des Fermenters wurde das Medium durch Zugabe der Natriumsulfidlösung reduziert und mit etwa 120 ml Schwefelsäure auf einen pH zwischen 7,0 und 7,5 eingestellt.

2.1.4 Kultivierung der Organismen

Organismus	Inkubationstemperatur	Animpfstärke
<i>Methanothermobacter thermoautotrophicus</i>	65°C	1 %
<i>Methanothermobacter marburgensis</i>	65°C	1 %
<i>Methanothermus fervidus</i>	85°C	2 %

Serum- und Druckflaschen

Alle Methanogenen wurden aus einer logarithmisch wachsenden Vorkultur mithilfe einer Spritze steril und anaerob in frisches Medium überimpft. Die Animpfstärke war dabei vom Organismus und dessen Wachstumsgeschwindigkeit abhängig. Um einen besseren Gasaus-

tausch zwischen Flüssig- und Gasphase zu erzielen, wurden die Kulturen liegend unter leichtem Schütteln (ca. 60 Upm) bei der jeweils optimalen Wachstumstemperatur inkubiert, bis die gewünschte Zellzahl erreicht war (siehe II.6.1).

Fermenter

Der Fermenter wurde nach Abkühlen auf ca. 50°C mit 500 ml exponentiell gewachsener Vorkultur ($1-6 \times 10^7$ Zellen/ml) angeimpft. Dabei handelte es sich um zwei 250 ml Kulturen, die in 1 l Druckflaschen gezogen wurden. Die Inkubation erfolgte bei 65°C unter Rühren (100 Upm) in einer H₂/CO₂-Gasphase (80:20, v/v) und bei einem Überdruck von 1 bar. Um eine höhere Zellzahl zu erreichen, fand nach etwa vier Tagen ein Gasaustausch statt, bei dem das entstandene Methan durch frisches H₂/CO₂ ersetzt wurde. Die Kultivierung erfolgte bis zur stationären Wachstumsphase, die nach 5 bis 6 Tagen erreicht wurde.

2.1.5 Anzucht auf festen Oberflächen

Die Anzucht von Zellen auf festen Oberflächen diente dazu, Zellanhänge bestmöglich zu erhalten, da auf diese Weise Scherkräfte durch Zentrifugations- und Pipettierschritte vermieden werden. Verschiedene Oberflächen (Cellulosekapillaren, Glaskohle, Deckgläschen, Pasteurpipetten) wurden in kleine Stücke geschnitten bzw. gebrochen und den Serumflaschen während der Medienherstellung zugesetzt. Nach erfolgtem Wachstum wurden die Serumflaschen geöffnet und die Materialien für weitere Versuche entnommen.

Zur Anzucht auf kohlebeschichtete Gold-Grids (400 square mesh) mussten diese zunächst im Plasma Cleaner hydrophilisiert und in einen Teflonhalter eingebracht werden. Der Teflonhalter wurde in der Anaerobenkammer den Serumflaschen zugegeben, die bereits Medium enthielten. Damit die Grids beim Eintauchen in die Flüssigkeit nicht aus den Aussparungen des Halters herausgespült wurden, wurden sie mit einem Tropfen MS-Medium benetzt.

2.2 LB-Medium (Miller, 1972)

2.2.1 Zusammensetzung des LB-Kulturmediums

Substanz	Menge
Pepton	10,0 g
Hefeextrakt	5,0 g
NaCl	10,0 g
Agar (nur für Platten)	15 g
H ₂ O _{millipore}	ad 1000 ml

2.2.2 Herstellung als Flüssigmedium und Agarplatten

Alle benötigten Bestandteile wurden eingewogen, in H₂O_{millipore} gelöst und autoklaviert (siehe II.3). Je nach Bedarf wurden dem Medium nach Abkühlen auf 55°C sterilfiltrierte Antibiotika in folgenden Endkonzentrationen zugegeben:

Substanz	Konzentration
Ampicillin, gelöst in H ₂ O, pH 7,5	100 µg/ml
Chloramphenicol, gelöst in Ethanol	34 µg/ml
Carbenicillin, gelöst in H ₂ O	200 µg/ml

Zur Herstellung von Agarplatten wurde das Medium nach dem Autoklavieren unter der Sterilbank in Plastikpetrischalen gegossen.

2.2.3 Kultivierung

E. coli-Stämme wurden unter aeroben Bedingungen in flüssigem Medium oder auf Agarplatten kultiviert. Zur Anzucht in kleinen Volumina wurden 5 ml Flüssigmedium in Reagenzgläser gefüllt, die mit Alukappen verschlossen und anschließend autoklaviert wurden (siehe II.3). Als Inokulum diente hierbei eine Einzelkolonie bzw. 5 µl Glycerinkultur (siehe II.4.7.9). Reaktionsgefäße für größere Anzuchten stellten 2 l Erlenmeyerkolben dar, die zu maximal 25 % befüllt, mit porösen Schaumstoffstopfen verschlossen und sterilisiert wurden. Es wurde mit 1 % einer gut gewachsenen Übernachtskultur angeimpft. Die Inkubation erfolgte bei 37°C im Rollordrum™ bzw. Wasserbadschüttler (Flüssigkulturen) oder Wärmeschrank (Agarplatten) unter den jeweiligen Selektionsbedingungen.

3 Sterilisation

Sämtliche Nährmedien, Puffer und hitzeunempfindliche Lösungen wurden für 20 min bei 121°C und 1,1 bar Überdruck unter feuchter Hitze im Autoklaven sterilisiert. Plastik- und Glaswaren wurden für 40 min unter gleichen Bedingungen autoklaviert, eine Ausnahme bildeten dabei Zentrifugenbecher aus Polypropylen, bei denen die Autoklavierdauer nur 15 min betrug. Hitzeempfindliche Lösungen wie Antibiotika, Mineralien- und Vitaminelexier wurden über einen bakteriendichten Filter mit einer Porenweite von 0,22 µm sterilfiltriert. Glaspipetten wurden 4 h bei 160°C unter trockener Hitze gebacken. Die Sterilisation von Elektroporationsküvetten erfolgte in der GS Genelinker UV Chamber durch zweimalige UV-Licht-Bestrahlung (Modus: Str.) für 90 s. Alle für die Arbeit mit RNA benötigten Lösungen und Gegenstände wurden gesondert behandelt (siehe II.4.2.1).

4 Molekulargenetische Methoden

4.1 Isolierung von genomischer DNA

Zur Isolierung von genomischer DNA aus *M. thermoautotrophicus* musste zunächst dessen stabile Pseudomureinschicht aufgeschlossen werden. Um die DNA vor mechanischen Einwirkungen zu schützen, wurde hierzu das Enzym Pseudomurein-Endoisopeptidase PeiP verwendet, welches die Zuckerketten des Pseudomureins spaltet (Luo *et al.*, 2002). Die Protease stammt ursprünglich aus dem virulenten Phagen ψM2, der *Methanothermobacter*-Arten infiziert (Pfister *et al.*, 1998) und lag zu Beginn der Arbeit rekombinant im *E. coli*-

Stamm BL21(DE3):pME2508 (Expressionsvektor pET-28a) vor. Die Expression und Reinigung dieses Enzyms erfolgte wie in II.5.3 beschrieben.

4.1.1 Zellaufschluss

Natriumphosphat-Puffer, pH 7,0		Na-Phosphat, pH 8,0	
Na-Phosphat, pH 8,0	40 mM	Na ₂ HPO ₄	100 mM
Tris/HCl	10 mM	NaH ₂ PO ₄	100 mM
DTT	5 mM	Es wurden zwei Stammlösungen erstellt und gegeneinander titriert, bis ein pH von 8,0 resultierte.	
MgCl ₂	2 mM		

Der pH wurde auf 7,0 eingestellt.

500 ml einer stationären *M. thermoautotrophicus*-Kultur (etwa 2×10^8 Zellen/ml) wurden 30 min bei $13.100 \times g$ geerntet (4°C, GSA-Rotor, Sorvall) und das Pellet in ca. 10 ml Natriumphosphat-Puffer (pH 7,0) gelöst. Die Suspension wurde in eine sterile Serumflasche überführt und mit 40 µg PeiP versetzt. Die Flasche wurde mit einem Gummistopfen versehen und über Nacht bei 65°C sanft schüttelnd (ca. 60 Upm) im Wärmeschrank inkubiert. Der Erfolg des Aufschlusses konnte lichtmikroskopisch untersucht werden.

4.1.2 Isolierung und Reinigung der DNA

TE-Puffer, pH 7,5	
Tris/HCl	10 mM
Na ₂ -EDTA	0,1 mM

Der pH wurde auf 7,5 eingestellt.

Der Zellaufschluss wurde so oft zentrifugiert (10 min, $4.000 \times g$, Centrifuge 5402), bis kein Pellet mehr sichtbar war. Der klare Überstand, der die genomische DNA enthielt, wurde unter dreimaligem Pufferwechsel gegen TE-Puffer (pH 7,5) dialysiert. Die Dialyse fand in Schläuchen mit einer Molekülausschlussgrenze von 8-10 kDa unter leichtem Rühren bei 8°C statt. Vor ihrer Verwendung wurden die Dialyseschläuche wie unter II.5.1.6 beschrieben vorbehandelt.

Zur Fällung der Nukleinsäuren wurde der Ansatz mit 0,1 Volumenanteilen 3 M Natriumacetat-Lösung (pH 7,5) und 2,5 Volumenanteilen eiskaltem EtOH_{absolut} versetzt und über Nacht bei -20°C inkubiert. Anschließend wurden die Präzipitate durch zehnminütige Zentrifugation bei $13.600 \times g$ und 4°C (Centrifuge 5402) pelletiert. Das Pellet wurde mit 300 µl eiskaltem, 70 %igem (v/v) EtOH gewaschen, nach erneuter Zentrifugation (s.o.) luftgetrocknet und schließlich in 200 µl sterilem, nukleasefreiem H₂O (Roth) gelöst.

Zur Beseitigung von Verunreinigungen wurde der Ansatz mit RNase A und Proteinase K behandelt. Hierzu wurden 100 µg RNase A zugegeben und 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Zugabe von 1 mg Proteinase K erfolgte eine einstündige Inkubation bei 55°C. Zur weiteren Reinigung schloss sich eine Phenol-Chloroform-Extraktion an. Dem Ansatz wurde zunächst 1 ml Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol (25:24:1) beigelegt, die Lösung

30 min geschüttelt und zur Phasentrennung 15 min bei 8.000 x g und 4°C zentrifugiert (Centrifuge 5402). Der Schritt wurde so lange wiederholt, bis die jeweils danach abgenommene wässrige Phase vollkommen klar war. Diese wurde mit 1 ml Chloroform versetzt, gut gemischt und unter gleichen Bedingungen zentrifugiert. Die wässrige Phase wurde abgenommen, mit 800 µl eiskaltem Isopropanol ausgeschüttelt, über Nacht bei -20°C inkubiert und schließlich für 5 min bei 15.700 x g und 4°C zentrifugiert (Centrifuge 5402). Die pelletierte DNA wurde mit 500 µl eiskaltem, 70 %igem (v/v) Ethanol gewaschen, luftgetrocknet und in 50 µl H₂O (Roth) gelöst. Die Lagerung erfolgte bei -20°C.

4.2 Isolierung von Gesamt-RNA

4.2.1 Hinweise zur Arbeit mit RNA

Alle für RNA-Arbeiten benötigten Gefäße und Lösungen mussten aufgrund der besonders stabilen Ribonukleasen gesondert behandelt werden. Da RNasen den Autoklaviervorgang (siehe II.3) unbeschadet überstehen, waren für ihre Inaktivierung entweder höhere Temperaturen, die Behandlung mit Diethylpyrocarbonat (DEPC) oder dem RNase-deaktivierenden Spray RNase AWAY® nötig. Glaswaren und Spatel wurden zur Sterilisation und Eliminierung der RNasen über Nacht bei 250°C trockener Hitze gebacken. Lösungen und H₂O_{millipore} wurden mit DEPC in einer Endkonzentration von 0,1 % (v/v) versetzt, über Nacht bei 37°C inkubiert und anschließend 20 min bei 121°C autoklaviert, wobei DEPC in die flüchtigen Produkte Ethanol und CO₂ zerfiel. Die Schraubdeckelgefäße, die für den Zellaufschluss im FastPrep-Homogenisator verwendet wurden, wurden über Nacht bei 37°C in mit 0,1 % (v/v) DEPC versetztem H₂O_{millipore} inkubiert, anschließend autoklaviert und getrocknet.

Es wurden ausschließlich Spitzen mit Aerosolfilter sowie Reaktionsgefäße verwendet, die als „RNase-frei“ deklariert waren. Arbeitsplatz, Pipetten und Gelelektrophoreseapparatur wurden mit RNase AWAY® behandelt. Die Arbeiten erfolgten wenn möglich unter der Sterilbank.

4.2.2 Zellaufschluss

Vor Beginn der RNA-Isolierung musste die stabile Zellwand von *M. thermoautotrophicus* aufgeschlossen werden. Aufgrund der langen Inkubationszeit war ein Aufschluss durch die Pseudomuramidase PeiP analog zu II.4.1.1 nicht geeignet. Als gute Alternative um intakte RNA zu erhalten erwies sich der mechanische Zellaufschluss mithilfe von Glaskügelchen im FastPrep®-Homogenisator unter Verwendung von Trizol (Sarbu, 2009). Zu diesem Zweck wurden 1,5 l stationär gewachsene Kultur (ca. 2 x 10⁸ Zellen/ml) 30 min bei 13.100 x g in der Sorvall-Zentrifuge (4°C, GSA-Rotor) geerntet, in TE-Puffer (siehe II.4.1.2) gewaschen und dabei auf zwei FastPrep®-Behälter aufgeteilt. Nach der Zentrifugation (10 min, 13.800 x g, Biofuge 13) wurden die Zellpellets in jeweils 1 ml Trizol resuspendiert und mit 0,5 g Glaskügelchen (Ø 0,17-0,18 mm) versetzt. Der Aufschluss erfolgte im FastPrep®-Homogenisator über 20 Zyklen à 40 s mit einer Geschwindigkeit von 5 m/s. Zwischen den Zyklen wurden die Ansätze 1 min in Eiswasser gekühlt. Durch fünfminütige Zentrifugation bei 15.700 x g und

4°C (Centrifuge 5402) wurden Glaskügelchen und größere Zellbestandteile von der RNA getrennt.

4.2.3 Isolierung und Reinigung der RNA

Der Überstand des Zellaufschlusses wurde mit 0,2 ml Chloroform versetzt und unter leichtem Schwenken 3 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach 15-minütiger Zentrifugation bei 11.600 x g und 4°C (Centrifuge 5402) wurde die wässrige Phase abgenommen, mit 0,5 ml eiskaltem Isopropanol gemischt und zur Fällung der Nukleinsäuren 30 min bei -20°C gelagert. Durch erneute Zentrifugation unter gleichen Bedingungen wurden die Nukleinsäuren pelletiert. Der Überstand wurde vorsichtig abgenommen, das Pellet mit 1 ml 70 %igem (v/v) Ethanol versetzt und zentrifugiert (5 min, 4.500 x g, 4°C, Centrifuge 5402). Nach Entfernen des Überstandes wurde das Pellet luftgetrocknet und schließlich in 100 µl nukleasefreiem H₂O (Roth) gelöst. Zur Beseitigung von DNA-Kontaminationen wurde die Nukleinsäurelösung mit 10 µl DNase I und 90 µl DNase I Incubation Buffer (*High Pure RNA Isolation Kit*) versetzt und 15 min bei Raumtemperatur inkubiert.

Zur weiteren Aufreinigung erfolgte eine Phenol-Chloroform-Fällung. Dabei wurde die Lösung mit einem Volumenanteil Phenol versetzt, gemischt und zur Phasentrennung 10 min bei 13.600 x g und 4°C (Centrifuge 5402) zentrifugiert. Die wässrige Phase wurde abgenommen, nacheinander mit einem Volumenanteil Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol (25:24:1) und einem Volumenanteil Chloroform ausgeschüttelt und wie oben beschrieben zentrifugiert. Die Fällung der in der wässrigen Phase enthaltenen RNA erfolgte durch Zugabe von 0,6 Volumenanteilen eiskaltem Isopropanol und 0,1 Volumenanteilen 3 M Natriumacetat (pH 7,5) und Inkubation für 30 min bei -20°C. Das durch Zentrifugation (s.o.) erhaltene RNA-Pellet wurde mit 1 ml 70 %igem (v/v), eiskaltem Ethanol gewaschen, luftgetrocknet und schließlich in 50 µl H₂O (Roth) gelöst. Die Lagerung der RNA erfolgte bei -70°C.

4.3 Quantifizierung von Nukleinsäuren

Die Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäurelösungen erfolgte mit dem Spektralphotometer NanoDrop unter Verwendung der entsprechenden Einstellungen für die Messung von DNA bzw. RNA. Zusätzlich zur Messung bei 260 nm erfasste das Gerät auch die Extinktionen bei 280 nm und 230 nm, die einen Hinweis auf Verunreinigungen mit Proteinen und Lösungsmitteln lieferten.

4.4 Reverse Transkription

Das Umschreiben von Gesamt-RNA in cDNA erfolgte unter Verwendung des *Transcriptor High Fidelity cDNA Synthesis Kits*. Es wurde entsprechend der Anleitung für eine anschließende quantitative PCR verfahren. Dabei wurden im ersten Schritt RNA, Primer und H₂O gemischt und die Sekundärstrukturen der RNA durch Inkubation bei 65°C aufgelöst. Nach

Zugabe der restlichen Komponenten erfolgte die reverse Transkription der RNA in cDNA sowie die Inaktivierung des Enzyms.

Komponente	Menge bzw. Volumen	Inkubationsschritt
RNA	1 µg	10 min 65°C, 2 min auf Eis
Random Hexamer Primer (600µM)	2 µl	
H ₂ O, PCR-grade	ad 11,4 µl	
Reaction Buffer, 5x	4 µl	10 min auf 29°C, 60 min auf 48°C, 5 min auf 85°C 2 min auf Eis
Protector RNase Inhibitor (40 U/µl)	0,5 µl	
Deoxynucleotide Mix (je 10 mM)	2 µl	
DTT	1 µl	
Reverse Transcriptase (9 U/µl)	1,1 µl	

Um aus einer reversen Transkription genügend Template für alle real-time PCRs zu erhalten, wurde ein dreifacher Ansatz gewählt. Als Negativkontrollen dienten ein Ansatz ohne RNA und einer ohne reverse Transkriptase. Zur anschließenden Konzentrationsbestimmung der cDNA über die ssDNA-Funktion des NanoDrop Photometers (siehe II.4.3) war es zunächst nötig, die eingesetzte RNA zu verdauen, um RNA/cDNA-Hybride zu beseitigen. Hierzu wurde den Ansätzen DNase-freie RNase in einer Endkonzentration von 5 ng/µl zugegeben und 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die cDNA wurde anschließend wie unter II.4.1.2 beschrieben mit Ethanol und Natriumacetat gefällt und in nukleasefreiem H₂O (Roth) resuspendiert. Der Erfolg der reversen Transkription konnte über Agarose-Gelelektrophorese (II.4.5) überprüft werden.

4.5 Agarose-Gelelektrophorese

50x TAE-Puffer, pH 8,2	
Tris	2 M
Eisessig	57,1 ml
Na ₂ -EDTA (0,5 M; pH 8)	100 ml
H ₂ O _{millipore}	ad 1000 ml

Der pH von 8,2 ergibt sich.

Sowohl DNA als auch RNA wurden über native Agarose-Gelelektrophorese analysiert. Grund hierfür waren Ergebnisse von Masek *et al.* (2004), die zeigten, dass die Qualität von Gesamt-RNA über native TAE-Agarosegele genauso gut dargestellt werden kann wie über die wesentlich aufwendigeren, denaturierenden MOPS/Formaldehyd-Agarosegele. Dabei haben die Autoren die RNA vor dem Beladen des nativen Gels in heißem Formamid denaturiert.

Die elektrophoretische Auftrennung von DNA-Fragmenten erfolgte über 0,7-1,5 %ige (w/v) Agarosegele und für Gesamt-RNA über 1,2 %ige Gele. Die entsprechende Menge Agarose wurde in der Mikrowelle in 1x TAE-Puffer aufgekocht, nach dem Abkühlen in eine Gel-apparatur gegossen und mit einem Gelkamm versehen. Für die Analyse von DNA wurde

Ethidiumbromid in einer Endkonzentration von 1 µg/ml vor dem Gießen der Agaroselösung zugegeben. Dieser Schritt entfiel für RNA-Proben aufgrund der Verwendung eines Ethidiumbromid enthaltenden Ladepuffers.

Vor dem Auftragen der Proben wurde die DNA mit 6x DNA-Ladepuffer versetzt. RNA wurde mit einem 2x RNA-Ladepuffer, der 95 % Formamid enthielt, gemischt, 10 min bei 70°C inkubiert und sofort auf Eis gekühlt. Um die Größe der Nukleinsäure-Fragmente bestimmen zu können wurde jeweils ein DNA- bzw. RNA-Molekularmassenstandard mitgeführt. Die Elektrophorese erfolgte bei etwa 70 Volt und konnte durch das Bromphenolblau im Ladepuffer verfolgt werden. Das Ergebnis wurde unter UV-Licht ($\lambda = 322 \text{ nm}$) im BioDoc-It Imaging System dokumentiert.

4.6 Polymerase-Chain-Reaction (PCR)

4.6.1 Standard-PCR für anschließende Klonierung

DNA-Fragmente, die als Insert in einen Vektor integriert werden sollten, wurden mit genspezifischen Primern, die die benötigten Restriktionsschnittstellen enthielten (siehe II.1.5), aus genomischer DNA amplifiziert. Die hierfür verwendete Phusion Polymerase (*Phusion High Fidelity PCR Kit*) zeichnet sich durch eine sehr geringe Fehlerrate sowie eine 3' → 5' Exonukleaseaktivität aus. Die PCR-Ansätze wurden in der Sterilbank auf Eis unter Verwendung von Filterspitzen in 0,2 ml Reaktionsgefäße nach folgendem Schema pipettiert:

Komponente	Volumen pro Reaktion
H ₂ O, PCR-grade	37 µl
Phusion HF Buffer, 5x	10 µl
dNTP Mix (je 10 mM)	1 µl
Primer vorwärts (100 µM)	0,25 µl
Primer rückwärts (100 µM)	0,25 µl
genomische DNA (150 ng/µl)	1 µl
Phusion Polymerase (2 U/µl)	0,5 µl

Die PCR wurde nach dem unten aufgeführten Programm durchgeführt. Dabei wurde die richtige Annealing-Temperatur über einen Temperaturgradienten bestimmt. Die Dauer der Elongationen richtete sich nach der Länge (in kb, Kilobasen) des zu amplifizierenden DNA-Fragments.

Schritt	Temperatur	Dauer	Zyklenzahl
Initiale Denaturierung	98°C	2 min	1
Denaturierung	98°C	7 s	} 25
Annealing	47-64°C	30 s	
Elongation	72°C	30 s pro kb	
Finale Elongation	72°C	10 min	1
Kühlung	4°C	∞	

4.6.2 Quantitative Reverse-Transkriptions-PCR (qRT-PCR)

Die qRT-PCR stellt eine exakte, schnelle und zuverlässige Methode zur Quantifizierung von mRNA-Transkripten dar. Sie wurde herangezogen um die Transkriptmengen der einzelnen Gene *mth61-mth58*, sowie der Operons *mth61/mth60* und *mth60-mth58* zu bestimmen. Im ersten Schritt der Genexpressions-Analyse musste zunächst RNA isoliert (siehe II.4.2) und revers in cDNA transkribiert werden (siehe II.4.4). Die anschließende Quantifizierung erfolgte während der qRT-PCR mithilfe des Fluoreszenzfarbstoffs SYBR Green I, der in doppelsträngige DNA interkaliert und damit nach jedem Zyklus die Menge entstandener PCR-Produkte anzeigt. In der exponentiellen Phase der qRT-PCR, in der sich die Template-DNA im Idealfall in jedem Zyklus verdoppelt, kann eine Quantifizierung anhand der Fluoreszenzsignale vorgenommen werden. Für die Auswertung muss zunächst ein Threshold festgelegt werden, wobei es sich um den Schwellenwert handelt, bei dem das Fluoreszenzsignal die Hintergrund-Fluoreszenz signifikant übersteigt. Durch den Threshold ergeben sich für alle Proben C_T -Werte (cycle threshold), aus denen auf die ursprünglich in die Reaktion eingesetzte Menge des jeweiligen Templates rückgeschlossen werden kann.

4.6.2.1 Überprüfung der Qualität der Primerpaare

Die qPCRs erfolgten unter Verwendung des *SensiMix™ SYBR No-ROX Kits*. Entsprechend der Herstellerangaben wurden die verwendeten Primerpaare (siehe II.1.5) so gewählt, dass die zu amplifizierende Sequenz ca. 150 bp umfasste. Vor Beginn der Quantifizierung musste zunächst die Effizienz der Primer bestimmt werden. Für diesen Zweck wurde der Vektor pET-14b, mit *mth61-mth58* als Insert (siehe II.4.7), als Template eingesetzt. Pro Primerpaar wurden vier zehnfach Verdünnungsstufen des Plasmids pipettiert, wobei die resultierenden DNA-Konzentrationen zwischen 15 pg/μl und 0,015 pg/μl betrugen. Die Verdünnungen wurden mit nukleasefreiem H₂O (Roth) hergestellt, welches stets auch in einer Negativkontrolle anstelle der DNA eingesetzt wurde (*no template control*, NTC). Für die qPCR wurde jede Verdünnungsstufe als Triplet eingesetzt, lediglich bei der NTC handelte es sich um eine Doppelprobe.

Die Reaktionsansätze wurden in der PCR Chamber unter Verwendung von Filterspitzen in 0,1 ml Strip Tubes pipettiert. Für jedes Primerpaar wurde ein Master Mix bestehend aus Reaktionsmix, Primern und H₂O angesetzt. Die DNA wurde jedem Reaktionsgefäß gesondert zugegeben und durch 20-faches Auf- und Abpipettieren mit dem Master Mix vermischt. Ein 10 μl Reaktionsansatz setzte sich wie folgt zusammen:

Komponente	Volumen pro Reaktion
2x SensiMix™ SYBR No-ROX	5 μl
Primer vorwärts (10 μM)	0,3 μl
Primer rückwärts (10 μM)	0,3 μl
H ₂ O, nukleasefrei	0,4 μl
DNA-Template (15 pg/μl bis 0,015 pg/μl)	4 μl

Die qPCRs wurden am Cycler Rotor-Gene 6000 unter Verwendung des folgenden Programms durchgeführt:

Schritt	Temperatur	Dauer	Zyklenzahl
Initiale Denaturierung	95°C	15 min	1
Denaturierung	94°C	15 s	} 40
Annealing	50°C	30 s	
Elongation	68°C	30 s	
Schmelzkurvenanalyse	62-95°C	je 5 s pro °C	1

Die Analyse und Auswertung der Ergebnisse erfolgte über die Rotor-Gene 6000 Software. Aus der eingesetzten DNA-Menge und den erhaltenen C_T -Werten wurde automatisch eine Standardkurve erstellt, aus der die Effizienz der Primerpaare hervorging. Diese sollte für eine aussagekräftige Quantifizierung mindestens 80 % betragen (www.sigmaaldrich.com; qPCR Technical Guide).

Da SYBR Green I unspezifisch an jede doppelsträngige DNA bindet, wurde nach Ende der PCR eine Schmelzkurvenanalyse durchgeführt, die aufzeigen konnte, ob ein spezifisches DNA-Fragment mit einer bestimmten Schmelztemperatur amplifiziert wurde.

4.6.2.2 Analyse der Transkriptmengen

Primerpaare, die das jeweilige qPCR-Produkt mit ausreichender Effizienz amplifiziert hatten, wurden für die Bestimmung der Transkriptmengen herangezogen. Dies erfolgte über eine absolute Quantifizierung, bei der erneut das Plasmid pET-14b mit Insert *mth61-mth58* für die Erstellung der Standardkurve analog zu II.4.6.2.1 herangezogen wurde. Dabei konnte die Anzahl der in die Reaktion eingesetzten Moleküle über Kenntnis der Konzentration sowie der Größe des Plasmids errechnet werden. Bei der von der Software ermittelten Standardkurve wurde der Logarithmus der Moleküle pro Reaktion gegen die zugehörigen C_T -Werte aufgetragen.

Für die Quantifizierung der mRNA-Transkripte wurde Gesamt-RNA isoliert (siehe II.4.2) und nach DNase-Verdau in cDNA umgeschrieben (siehe II.4.4). Die eingesetzte RNA wurde anschließend mit RNase verdaut und die cDNA-Konzentration am NanoDrop bestimmt. Für die qRT-PCR wurden von der cDNA vier zehnfach Verdünnungsstufen in Konzentrationen zwischen 31 ng/μl und 31 pg/μl erstellt und jeweils als Triplet-Ansätze in die Reaktion eingesetzt. Neben der *no template control* mit H₂O wurde auch stets eine Kontrolle mitgeführt, in der die Negativkontrolle aus der reversen Transkription (ohne reverse Transkriptase) als Template eingesetzt wurde. Dies konnte Verunreinigungen der RNA mit genomischer DNA aufzeigen.

Die qRT-PCRs wurden entsprechend dem unter II.4.6.2.1 genannten Pipettierschema und Temperaturprogramm durchgeführt. Nach automatischer Festlegung des Thresholds wurde von allen Dreifachproben mithilfe der Software der C_T -Mittelwert berechnet, wobei einzelne

Ausreißer davon ausgeschlossen werden konnten. Aus den C_T -Werten und der Standardkurve ermittelte das Programm die Anzahl der cDNA-Moleküle pro Reaktion. Das Ergebnis konnte unter Einbeziehung des Verdünnungsfaktors und der cDNA-Konzentration in Moleküle pro ng cDNA umgerechnet werden. Zur Auswertung gehörte ebenfalls die Analyse der Schmelzkurven. Um ein verlässliches Ergebnis zu erhalten wurden für jedes Primerpaar drei qRT-PCR-Läufe durchgeführt.

4.7 Klonierung

Bis auf eine Ausnahme (siehe II.4.7.9) wurden alle Klonierungen wie folgt durchgeführt: Zunächst wurde das entsprechende DNA-Fragment über PCR amplifiziert und dabei mit Restriktionsschnittstellen versehen (siehe II.4.6.1). Mithilfe des Programms NEBcutter V2.0 (<http://tools.neb.com/NEBcutter2>) wurde vorher sichergestellt, dass die Schnittstellen nicht auch innerhalb der zu klonierenden Sequenz enthalten waren. Nach der Restriktionshydrolyse und Ligation fand die Transformation in *E. coli* DH5 α statt, wobei die Selektion der Transformanten über die Ampicillin-Resistenz des Vektors ermöglicht wurde. Klone, die das Plasmid mit integriertem Insert enthielten, wurden auf Sequenzrichtigkeit geprüft, bevor die Transformation in einen *E. coli*-Expressionsstamm sowie die Induktion der Genexpression folgte (siehe II.5.3).

4.7.1 Restriktionshydrolyse

Vektoren und PCR-Produkte, denen über die Primer am 5'- und 3'-Ende der proteinkodierenden Sequenz die benötigten Restriktionsschnittstellen angefügt worden waren, konnten mithilfe von Restriktionsendonukleasen geschnitten werden. Dabei handelte es sich um Doppelverdaue. Der zu verwendende 10x Puffer richtete sich nach den eingesetzten Enzymen und wurde entsprechend der Herstellerangaben ausgewählt. In 10 μ l-Ansätzen wurden ca. 500 ng DNA mit Puffer, Enzym und gegebenenfalls BSA versetzt und bei 37°C für 3 h inkubiert. Sowohl im Fall der Inserts als auch der Plasmide wurden die Enzyme und abgespaltenen Nukleotide nach Ablauf der Reaktionszeit mit dem *QIAquick PCR Purification Kit* entfernt. Die Elution erfolgte in 20 μ l H₂O_{millipore}. Über Agarose-Gelelektrophorese (siehe II.4.5) konnten die DNA-Konzentrationen abgeschätzt sowie die vollständige Spaltung des Plasmids überprüft werden.

4.7.2 Ligation

Für die Ligation wurden Insert und Vektor in einem Verhältnis von etwa 2:1 eingesetzt. Die Ligation erfolgte mithilfe der T4 DNA-Ligase und des zugehörigen Ligationspuffers in einem Gesamtvolumen von 10 μ l, wobei je 1 μ l 10x Puffer und Enzym verwendet wurden. Der Ansatz wurde über Nacht bei 16°C inkubiert. Am folgenden Tag wurden die Konstrukte über eine Ethanolfällung analog zu II.4.1.2 von Enzym-, Puffer- und Salzresten gereinigt, in 5 μ l sterilem H₂O_{millipore} aufgenommen und in eine Transformation eingesetzt (siehe II.4.7.4).

4.7.3 Herstellung kompetenter Zellen

Für Transformationsexperimente wurden sowohl elektrokompetente als auch chemisch kompetente *E. coli*-Zellen benötigt.

Elektrokompetente Zellen

5 ml einer Übernachtskultur des gewünschten *E. coli*-Stammes wurden verwendet, um einen Kolben mit 250 ml (bedarfswise selektivem) LB-Medium zu beimpfen. Die Zellen wurden bei 37°C bis zu einer OD₆₀₀ von 0,4 bis 0,6 im Wasserbadschüttler inkubiert und anschließend unter sterilen Bedingungen geerntet (15 min, 4.000 x g, 4°C, GSA-Rotor, Sorvall). Alle weiteren Arbeitsschritte erfolgten auf Eis. Die pelletierten Zellen wurden zunächst mit 250 ml, dann mit 100 ml, 50 ml und schließlich mit 20 ml sterilem, 10 %igem (v/v) Glycerin gewaschen und jeweils unter oben genannten Bedingungen abzentrifugiert. Zuletzt wurde das Pellet in 2 ml 10 %igem (v/v) Glycerin resuspendiert, zu je 40 µl aliquotiert und bei -70°C gelagert.

Chemisch kompetente Zellen

Chemisch kompetente Zellen standen bereits zur Verfügung und wurden nicht selbst hergestellt. Die Vorgehensweise kann aus vorangegangenen Arbeiten entnommen werden (z.B. Schopf, 2011).

4.7.4 Transformation in kompetente *E. coli*-Zellen

Für die Transformation von Plasmiden in Bakterienzellen standen zwei Methoden zur Verfügung, die sich nach der Art der kompetenten Zellen richteten.

Elektroporation

Der Ligationsansatz (siehe II.4.7.2) wurde vorsichtig mit einem 40 µl-Aliquot der auf Eis aufgetauten, kompetenten *E. coli*-Zellen gemischt und 5 min auf Eis gelagert. Die Suspension wurde in eine sterile und auf Eis gekühlte Elektroporationsküvette (2 mm Plattenabstand) pipettiert. Diese wurde sorgfältig abgetrocknet und in die Pulsapparatur überführt. Der Elektropuls erfolgte bei 2 kV, 800 Ω und 25 µF. Sofort nach dem Puls wurden die Zellen mit 200 µl kaltem LB-Medium aus der Küvette gespült, in ein steriles 1,5 ml-Reaktionsgefäß überführt und 5 min auf Eis gestellt. Um den transformierten Zellen die Expression ihrer Antibiotikaresistenz zu ermöglichen, erfolgte eine einstündige Inkubation bei 37°C. Schließlich wurden die Zellen in verschiedenen Aliquots (10 µl, 25 µl, 50 µl und 150 µl) auf selektiven LB-Platten ausplattiert und über Nacht bei 37°C bebrütet.

Chemische Transformation über Hitzeschock

Eine chemische Transformation wurde nur beim *E. coli*-Expressionsstamm BL21(DE3)pLysS durchgeführt. Zu diesem Zweck wurde ein 100 µl-Aliquot der kompetenten Zellen langsam aufgetaut, mit dem Ligationsansatz vermischt und 30 min auf Eis inkubiert. Der Hitzeschock fand für 90 s bei 42°C im Thermoblock statt und wurde von einer zweiminütigen Inkubation

auf Eis und der Zugabe von 800 µl LB-Medium gefolgt. Eine einstündige Erholungsphase bei 37°C gewährleistete die maximale Transformationsrate. Die transformierten Zellen wurden in unterschiedlichen Verdünnungen auf selektiven LB-Platten ausgestrichen. Dazu wurden zunächst 100 µl der Suspension ausplattiert. Der restliche Ansatz wurde kurz abzentrifugiert, das Zellpellet in einem kleinen Volumen des Überstandes resuspendiert und ebenfalls auf eine Agarplatte ausplattiert. Die Inkubation erfolgte über Nacht bei 37°C.

4.7.5 Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli*

Bei den Kolonien, die nach der Transformation auf selektiven LB-Platten gewachsen waren, handelte es sich um Zellen, die ein Plasmid aufgenommen hatten. Zur Isolierung dieser Plasmide wurde je eine Kolonie in 5 ml selektives LB-Medium überführt und ca. 15 h bei 37°C inkubiert. Die Zellen wurden abzentrifugiert (5 min, 5.000 x g, Biofuge 13) und die enthaltenen Plasmide mit dem *peqGOLD Plasmid Miniprep Kit* nach Herstellerangaben isoliert. Die Elution erfolgte schließlich in 30 µl H₂O_{millipore}.

4.7.6 Screening der Klone

Die Plasmide wurden mittels Restriktionsverdau auf das Enthalten eines Inserts überprüft. Dabei erfolgte ein Einzelverdau mit einem Enzym, das im Insert keine und im Vektor nur eine Schnittstelle aufwies. Aus der Laufweite der linearisierten Plasmide in einem Agarosegel konnte auf das Vorhandensein des Inserts geschlossen werden. Als Kontrolle diente dabei das leere und unter den gleichen Bedingungen verdaute Plasmid.

4.7.7 DNA-Sequenzierung und Sequenzdatenanalyse

Zur Überprüfung der Sequenz des Inserts wurden speziell generierte Primer (siehe II.1.5) eingesetzt, die sowohl das Insert als auch die unmittelbar umgebende *multiple cloning site* des Vektors abdeckten. Zur Absicherung erfolgte die Sequenzierung stets entlang beider komplementärer DNA-Stränge. Alle Sequenzierungen wurden bei der Firma Life Technologies, Regensburg, in Auftrag gegeben, wobei die Proben gemäß den Vorgaben vorbereitet wurden. Die Auswertung der Daten erfolgte mit der Software BioEdit (Hall, 1999) und Sequenzen wurden mit dem Programm ClustalW (Thompson *et al.*, 1994) des EBI (European Bioinformatics Institute, <http://www.ebi.ac.uk>) aligniert.

4.7.8 Anlegen von Glycerinkulturen

E. coli-Transformanten, die das gewünschte Insert fehlerfrei enthielten, wurden durch Einlegen in Glycerin dauerkonserviert. Zu diesem Zweck wurden 2 ml exponentiell gewachsene Kultur geerntet (2 min, 3.000 x g, Biofuge 13) und in 0,5 ml frischem, selektivem LB-Medium resuspendiert. Die Zellsuspension wurde in ein Schraubdeckelgefäß überführt, das 0,5 ml steriles 99,5 %iges (v/v) Glycerin p.a. enthält. Die Glycerinkultur wurde durch Vortexen homogenisiert und bei -20°C gelagert.

4.7.9 Erstellung und Klonierung des Genkonstruktes *mth60/mth59*

Die Klonierung des Gens *mth60* stellte eine Besonderheit dar und wich von den zuvor beschriebenen Schritten ab. Grund hierfür waren Ergebnisse aus einer vorausgegangenen Arbeit, die zeigten, dass *mth60* aufgrund seiner toxischen Wirkung nicht allein in *E. coli* exprimiert werden kann (Frank, 2006). Aus diesem Grund sollte ein künstliches Genkonstrukt bestehend aus *mth60* und *mth59* erstellt werden, das an die *codon usage* von *E. coli* angepasst sein sollte. Diese Arbeit wurde bei Life Technologies, Regensburg, in Auftrag gegeben. Dabei wurden zwei Konstrukte hergestellt:

Konstrukt I setzte sich zusammen aus der vollständigen *mth60*-Gensequenz mit einer C-terminalen His-Tag-Sequenz, die von einer intergenen Region, *mth59* und einem Terminator gefolgt wurde. Dieses Konstrukt wurde von Life Technologies in den Vektor pET-11a kloniert. Konstrukt II unterschied sich dahingehend von Konstrukt I, dass die ersten 33 Basenpaare, die das Signalpeptid des Mth60 darstellen, durch die Sequenz eines His-Tags ersetzt wurden. Des Weiteren wurde die intergene Region zwischen *mth60* und *mth59* um 21 Basenpaare verkürzt. Konstrukt II wurde als Insert in pET-15b geliefert.

Ein genaues Schema der Konstrukte ist zur besseren Veranschaulichung der erhaltenen Ergebnisse unter III.3.2 dargestellt. Die vollständigen Sequenzen sowie die von Life Technologies erhaltenen Diagramme bezüglich der verbesserten *codon quality* befinden sich auf der Begleit-CD (siehe VI.5). Beide Konstrukte wurden nach der Transformation in einen *E. coli*-Expressionsstamm für die Herstellung rekombinanter Proteine eingesetzt.

5 Proteinbiochemische Methoden

5.1 Isolierung und Aufreinigung von Fimbrien

Um die Zellanhänge von *M. thermoautotrophicus* aufzureinigen, wurde der Organismus in einem 100 l Fermenter kultiviert. Da unklar war, ob die Fimbrien bei der Zellernte abbrechen, wurde versucht, sie sowohl durch Abscheren von den Zellkörpern, als auch durch Präzipitation aus dem Zentrifugationsüberstand zu isolieren. Je nach Vorhaben wurden dabei unterschiedliche Zentrifugationsbedingungen gewählt.

Zusätzlich sollten Fimbrien von *M. thermoautotrophicus*, *M. marburgensis* und *M. fervidus* aus pelletierten Zellen durch Herauslösen aus der Zellwand gewonnen werden. Dies geschah unter Verwendung der Pseudomuramidase PeiP.

5.1.1 Zellernte

Nach Erreichen der stationären Wachstumsphase (ca. $2\text{--}3 \times 10^8$ Zellen/ml) wurde der Fermenter zur Zellernte auf 18°C abgekühlt und über einen Schlauch direkt an die Padberg-, oder für eine sanftere Ernte an die Heraeus-Durchlaufzentrifuge angeschlossen. Die Zentrifugation erfolgte in der Padberg-Zentrifuge bei $16.500 \times g$ und 4°C mit einer Durchflussrate von 310 ml/min, im Fall der Heraeus-Zentrifuge fand die Zellernte bei $7.800 \times g$ unter Raumtemperatur mit einer Durchlaufgeschwindigkeit von 100 ml/min statt.

Die sanftere Zellernte sollte ein vorzeitiges Abscheren der Fimbrien von den Zellkörpern verhindern oder zumindest minimieren und wurde für eine nachfolgende Ultra-Turrax-Behandlung herangezogen. Die sich im Rotor der Heraeus-Durchlaufzentrifuge befindende Zellsuspension von etwa 600 ml wurde hierzu in der Sorvall-Zentrifuge pelletiert (35 min, 13.100 x g, 4°C, GSA-Rotor) und anschließend wie unter II.5.1.2 beschrieben verfahren. Zur Isolierung der Fimbrien aus dem Zentrifugationsüberstand fand die Zellernte unter Verwendung der Padberg-Zentrifuge statt. Der Überstand des 100 l Fermenters wurde in zwei 50 l Kunststoffbehälter aufgefangen und die Proteine präzipitiert (II.5.1.3).

5.1.2 Isolierung über Ultra-Turrax-Behandlung

Zur Isolierung der Fimbrien aus geernteten Zellen wurde das Zellpellet in 100 ml aerobem MS-Waschpuffer (siehe II.2.1.1) resuspendiert und die Fimbrien mittels Ultra-Turrax abgeschert. Die Behandlung erfolgte 1 min bei 13.000 Upm und 20 s bei 22.000 Upm. Zur Aufreinigung der Fimbrien aus der Suspension folgte eine differentielle Zentrifugation. Dabei wurden zunächst Zellen, Zelltrümmer und ausgeflockte Medienbestandteile in der Sorvall-Zentrifuge durch zwei 30-minütige Zentrifugationsschritte bei 4°C entfernt (17.000 x g, GSA-Rotor und 28.000 x g, SS-34-Rotor, Sorvall). Anschließend wurden die Fimbrien in der Ultrazentrifuge 2 h bei 85.000 x g pelletiert (4°C, 70Ti-Rotor, Beckman Ultrazentrifuge). Die Resuspension des Pellets erfolgte in ca. 500 µl 0,1 M HEPES (pH 7,0) durch sanftes Schütteln über Nacht im Kühlraum. Zur weiteren Aufreinigung wurde eine Dichtegradientenzentrifugation angeschlossen (siehe II.5.1.5).

5.1.3 Isolierung aus dem Zentrifugationsüberstand

Zur Isolierung von Fimbrien aus dem Zentrifugationsüberstand wurde dieser mit 10,5 % (w/v) Polyethylenglycol (PEG) 6000 und 5,8 % (w/v) NaCl versetzt und die Suspension nach dem Lösen der Chemikalien ca. 40 h bei 8°C gelagert. Die ausgefallenen Proteine wurden anschließend in der Heraeus-Durchlaufzentrifuge bei 12.000 g und 8°C mit einer Durchflussrate von 260 ml/min aufkonzentriert. Die sich im Rotor befindende Präzipitat-Lösung (ca. 600 ml) wurde in der Sorvall-Zentrifuge weiter eingeeengt (45 min, 13.100 x g, 4°C) und zum Schluss in der Ultrazentrifuge 2 h bei 85.000 x g pelletiert (4°C, 70Ti-Rotor, Beckman Ultrazentrifuge). Das Pellet wurde in etwa 1 ml 100 mM HEPES (pH 7,0) durch sanftes Schütteln über Nacht im Kühlraum resuspendiert und zur weiteren Reinigung der Fimbrien einer Dichtegradientenzentrifugation unterzogen (siehe II.5.1.5).

5.1.4 Isolierung mittels Pseudomuramidase PeiP

Diese Methode zur Isolierung von Fimbrien ergab sich aus den Versuchsergebnissen zum Zellaufschluss (siehe II.5.2) und wurde genutzt, um Fimbrien von *M. thermoautotrophicus*, *M. marburgensis* und *M. fervidus* zu isolieren. In diesem Fall wurden die Organismen in mehreren 1 l Druckflaschen bis zur stationären Wachstumsphase (ca. 1×10^8 Zellen/ml) gezogen.

Das Gesamtvolumen der Kulturen betrug im Fall von *M. thermoautotrophicus* und *M. marburgensis* 2,5 l, für *M. fervidus* 4 l. Nach der Zellernte (30 min, 13.100 x g, 4°C, GSA-Rotor, Sorvall) wurde das Pellet in etwa 15 ml MS-Waschpuffer (siehe II.2.1.1) aufgenommen, in eine sterile Serumflasche überführt und mit 250 bzw. 500 µg Pseudomuramidase PeiP (siehe II.4.1) versetzt. Die Flasche wurde verschlossen und die Suspension über Nacht bei 65°C im Heißluftinkubator unter leichtem Schütteln (50 Upm) inkubiert. Eine 15-minütige Zentrifugation bei 13.800 x g (Biofuge 13) trennte Zellen und größere Zellkomponenten von den freigewordenen Fimbrien, die sich nunmehr im Überstand befanden. Zur Aufreinigung der Fimbrien wurde der Überstand einer Ultrazentrifugation und einer anschließenden Resuspension analog zu II.5.1.2 unterzogen und über CsCl-Dichtegradientenzentrifugation aufgereinigt.

5.1.5 Cäsiumchlorid-Dichtegradientenzentrifugation

Fimbrien enthaltende Suspensionen konnten über isopyknische CsCl-Dichtegradientenzentrifugation weiter aufgereinigt werden. Zu diesem Zweck wurden die Ultrazentrifugationsröhrchen Ultra-Clear mit 4,5 ml eines Gemisches, bestehend aus der Proteinlösung, 100 mM HEPES-Puffer (pH 7,0) und Cäsiumchlorid in einer Endkonzentration von 0,55 g/ml, befüllt. Die Zentrifugation erfolgte mindestens 48 h bei 300.000 x g und 4°C (SW 60Ti-Rotor, Beckman Ultrazentrifuge), wobei sich die Proteine im entstandenen Dichtegradienten an der Stelle positionierten, die ihrer Schwebedichte entsprach. Die resultierenden Banden wurden mittels Spritze und Kanüle durch seitliches Punktieren des Röhrchens abgezogen. Zur Entfernung des Cäsiumchlorids wurden die Fraktionen sogleich einer Dialyse unterzogen.

5.1.6 Dialyse der Fraktionen

Die Proteinfraktionen wurden unter mehrmaligem Pufferwechsel gegen 5 mM HEPES (pH 7,0) bei 8°C dialysiert. Hierzu wurden bereits im Vorfeld Dialyseschläuche mit einer Molekülausschlussgrenze von 8-10 kDa in ca. 15 cm lange Stücke geschnitten und 15 min in einer Lösung aus 0,1 M NaHCO₃ und 1 mM Na₂-EDTA aufgekocht. Nach gründlichem Spülen mit H₂O_{millipore} wurden sie in einer Lösung bestehend aus 15 mM NaCl und 2 mM Na₃-Citrat (pH 7,0) autoklaviert. Die Lagerung erfolgte bei 8°C.

Nach Beendigung der Dialyse wurden alle Fraktionen elektronenmikroskopisch, über die Herstellung von Suspensionspräparaten (siehe II.7.1), sowie proteinbiochemisch, über SDS-PAGE (siehe II.5.5), auf ihren Fimbriengehalt und Reinheitsgrad hin untersucht.

5.2 Zellaufschluss zur Analyse von Proteinen

Zellaufschlüsse von *M. thermoautotrophicus* wurden einerseits zur Isolierung von Gesamtzellproteinen, die in Co-Immunpräzipitationen (siehe II.5.8.1) eingesetzt werden sollten und andererseits zur Fraktionierung der Zellbestandteile durchgeführt. Letzteres diente einer Analyse der subzellulären Lokalisation von Mth59.

Für die Co-Immunpräzipitationsexperimente wurden zwei Zellaufschluss-Varianten vergleichend durchgeführt, wobei es sich um einen mechanischen Aufschluss über Glaskügelchen bzw. einen proteolytischen Verdau der Zellwand mittels der Pseudomurein-Endoisopeptidase (PeiP) handelte. Zu diesem Zweck wurden 1,5 l stationär gewachsene Kultur mit einer Zellzahl von ca. 1×10^8 Zellen/ml geerntet (30 min, 13.100 x g, GSA-Rotor, Sorvall), das Pellet in MS-Waschpuffer (siehe II.2.1.1) gewaschen, in 2 ml des Puffers resuspendiert und auf zwei Ansätze aufgeteilt.

Für den mechanischen Zellaufschluss wurde zunächst eine Protease Inhibitor Cocktail Tablette in der Suspension gelöst, diese auf zwei FastPrep-Schraubdeckelgefäße aufgeteilt und mit jeweils 0,5 g Glaskügelchen (\varnothing 0,17-0,18 mm) versetzt. Der Aufschluss erfolgte im FastPrep-Homogenisator in 20 Zyklen à 40 s bei einer Geschwindigkeit von 5 m/s. Der Erfolg wurde im Anschluss lichtmikroskopisch kontrolliert. Zur Entfernung der Glaskügelchen und größerer Zellfragmente wurden die Ansätze 15 min bei 13.800 x g (Biofuge 13) zentrifugiert und die Überstände in einem Protein LoBind Tube vereinigt.

Für den enzymatischen Zellaufschluss wurde die Zellsuspension in ein Protein LoBind Tube überführt, mit 40 µg PeiP (siehe II.4.1) versetzt und über Nacht im Thermoblock bei 65°C schüttelnd inkubiert. Um die Wirkung des Enzyms nicht zu beeinträchtigen, erfolgte die Zugabe einer Protease Inhibitor Tablette erst am nächsten Morgen, anschließend wurden die Zelltrümmer durch Zentrifugation unter oben genannten Bedingungen entfernt.

Bis zu ihrer Verwendung wurden die Lösungen im Kühlraum aufbewahrt. Eine Analyse erfolgte über SDS-PAGE und Western Blot (siehe II.5.6) sowie elektronenmikroskopisch über Suspensionspräparate (siehe II.7.1).

Zur Fraktionierung der Zellbestandteile wurde zunächst ein Zellaufschluss unter Verwendung von PeiP durchgeführt (siehe oben), gefolgt von einer Ultraschall-Behandlung (12 x 3 min, duty cycle 50 %, output level 5). Der Erfolg des Aufschlusses wurde lichtmikroskopisch überprüft. Eine zweistündige Ultrazentrifugation bei 165.000 x g (4°C, 70Ti-Rotor, Beckman Ultrazentrifuge) ergab ein geschichtetes Pellet, wobei die einzelnen Schichten (Fraktionen) in MS-Puffer resuspendiert und über SDS-PAGE und Western Blot analysiert wurden. Der Zentrifugationsüberstand enthielt die cytosolischen Proteine und wurde ebenfalls untersucht.

5.3 Heterologe Genexpression in *E. coli*

Klonierte pET-Vektoren (siehe II.4.7), die das Zielgen fehlerfrei aufgenommen hatten wurden nach Transformation in einen *E. coli*-Expressionsstamm zur Herstellung rekombinanter Proteine herangezogen. pET-Vektoren (plasmid for Expression by T7 RNA polymerase) enthalten dazu den T7-Promotor, unter dessen Kontrolle sich das Zielgen befindet. Dieser Promotor wird nur von der T7-RNA-Polymerase, nicht jedoch von der *E. coli*-RNA-Polymerase erkannt. *E. coli*-Expressionsstämme enthalten aus diesem Grund in ihrem Genom Kopien des Gens der T7-RNA-Polymerase. Diese Expressionsstämme haben den Zusatz (DE3), da die Sequenzen mithilfe des lysogenen Phagen DE3 in ihr Genom integriert worden

waren. Die Expression der T7-RNA-Polymerase steht unter Kontrolle des lac-Promotors und wird normalerweise durch den lac-Repressor verhindert, der an den lac-Operator bindet. Das Lactose-Analogon Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid (IPTG) bindet an und inaktiviert den Repressor, so dass die Expression der T7-RNA-Polymerase und damit auch die Expression des Zielgens stattfinden kann. Auf diese Weise kann die basale Genexpression bis zum Start der Induktion niedrig gehalten werden. Zusätzlich sorgt bei Verwendung von bestimmten *E. coli*-Expressionsstämmen das Plasmid pLysS für eine Unterdrückung der basalen Transkription durch die Produktion von T7-Lysozym, einem natürlichen Inhibitor der T7-RNA-Polymerase.

Durch Expression im Vektor pET-14b wird dem rekombinanten Protein ein N-terminaler His-Tag, bestehend aus sechs konsekutiven Histidin-Resten, angefügt. Dieser ermöglicht eine Aufreinigung über Nickel-Chelat-Affinitätschromatographie und kann durch einen Verdau mit Thrombin abgespalten werden.

5.3.1 Induktion der Proteinexpression

Um die optimalen Bedingungen für die Expression zu ermitteln, wurden zunächst Test-Induktionen angesetzt, bei denen unterschiedliche IPTG-Konzentrationen, Inkubationstemperaturen und -zeiten überprüft wurden. Zu diesem Zweck wurden 500 ml selektives LB-Medium mit 5 ml einer *E. coli*-Übernachtskultur angeimpft und bei 37°C bis zu einer OD₆₀₀ von ca. 0,5 schüttelnd inkubiert. Durch Zugabe von IPTG (Endkonzentrationen zwischen 0,4 mM und 1 mM) wurde die Genexpression induziert. Die weitere Inkubation erfolgte schüttelnd bei Temperaturen zwischen 15° und 37°C, wobei zu unterschiedlichen Zeitpunkten (45 min, 90 min, 3 h, 6 h, über Nacht) 50 ml-Proben entnommen und zentrifugiert wurden (15 min, 4.500 x g, Labofuge GL). Zusätzlich diente eine Probe vor der IPTG-Zugabe als Nullkontrolle.

Aus den Zellpellets wurden die löslichen bzw. unlöslichen cytosolischen Proteinfractionen aufgereinigt. Dies erfolgte entsprechend der Anleitung der *Protino*[®] *Ni-TED 2000 Packed Columns* und unter Verwendung der zugehörigen Puffer, weswegen an dieser Stelle nur in gekürzter Form darauf eingegangen wird. Die Zellen wurden in LEW-Puffer resuspendiert, der zuvor mit dem Proteaseinhibitor Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF) versetzt worden war. Der Zellaufschluss erfolgte über Lysozym und Ultraschall (6 x 1 min, duty cycle 50 %, output level 5) und wurde lichtmikroskopisch kontrolliert. Im Anschluss wurde die enthaltene DNA über Zugabe von DNase I verdaut. Nach einer Zentrifugation für 30 min bei 17.000 x g und 4°C (SS-34-Rotor, Sorvall) befanden sich die Proteine der löslichen cytosolischen Fraktion im Überstand.

Waren die Proteine dagegen vorwiegend im Pellet, das die unlösliche Fraktion darstellte, so wurde dieses unter denaturierenden Bedingungen mit 8 M Harnstoff aufgereinigt. Hierzu wurden ein denaturierender Solubilisierungs- sowie Elutionspuffer entsprechend der Herstelleranleitung angefertigt und vor Verwendung ebenfalls mit PMSF komplettiert. Das

Pellet wurde in denaturierendem Solubilisierungspuffer resuspendiert und auf Eis geschüttelt. Nach Zentrifugation für 30 min bei 17.000 x g (4°C, SS-34-Rotor, Sorvall) befanden sich die Proteine der unlöslichen Fraktion im Überstand.

Die Fraktionen konnten über SDS-PAGE (siehe II.5.5) bzw. Western Blot (siehe II.5.6) auf ihren Gehalt an rekombinantem Protein hin untersucht werden. Einen Hinweis auf die Lokalisation der rekombinanten Proteine lieferte bereits die Lichtmikroskopie der *E. coli*-Zellen. Bei stark lichtbrechenden Strukturen innerhalb der Zellen handelte es sich um Einschlusskörperchen (*inclusion bodies*), die fast ausschließlich aus rekombinanten Proteinen bestehen. *Inclusion bodies* stellen die unlösliche cytosolische Fraktion dar und müssen unter denaturierenden Bedingungen solubilisiert werden.

Waren die optimalen Bedingungen für die Synthese der gewünschten Proteine gefunden, so wurden Expressionen in größerem Maßstab (in mehreren 2 l Erlenmeyerkolben parallel) angesetzt. Nach Beendigung der Expression wurden die Zellen 15 min bei 7.900 x g und 4°C geerntet (GSA-Rotor, Sorvall) und die rekombinanten Proteine wie oben beschrieben isoliert. Die weitere Aufreinigung erfolgte im Anschluss über Affinitätschromatographie.

5.3.2 Aufreinigung über Affinitätschromatographie

5.3.2.1 Nickel-Chelat-Affinitätschromatographie

Alle rekombinant hergestellten Proteine besaßen einen N- bzw. C-terminalen Polyhistidin-Tag, der eine einfache Aufreinigung über Nickel-Säulen ermöglichte. Dieses Aufreinigungsprinzip beruht auf einer hohen Affinität zwischen den Histidinen und den immobilisierten Ni²⁺-Ionen. Nach mehreren Waschschritten konnten die rekombinanten Proteine durch Zugabe des Histidin-Analogons Imidazol kompetitiv verdrängt und dadurch eluiert werden.

Die Aufreinigung der rekombinanten Proteine erfolgte über die *Protino*® Ni-TED 2000 Packed Columns nach Herstellerangaben entweder unter nativen oder denaturierenden Bedingungen. Die Eluate wurden in Fraktionen gesammelt und sogleich einer Dialyse unterzogen (siehe II.5.3.3). Alle Fraktionen konnten über SDS-PAGE analysiert werden.

5.3.2.2 Antikörper-Affinitätschromatographie

Eine weitere Möglichkeit rekombinante Proteine aufzureinigen, bestand in der Verwendung spezifischer Antikörper, die an einer *HiTrap*® NHS-activated HP Säule immobilisiert worden waren. Bei dem Säulenmaterial handelte es sich um N-Hydroxysuccinimid (NHS)-aktivierte Sepharose, an die die Liganden über ihre primären Amine kovalent zu binden vermochten.

Die Antikörper-Affinitätschromatographie wurde für die Aufreinigung von rekombinantem Mth60 genutzt, das durch Expression des Genkonstrukts *mth60/mth59* (siehe II.4.7.9) erhalten und nicht über Nickel-Affinitätschromatographie aufgereinigt werden konnte. Als Antikörper dienten jene, die gegen die Fimbrien von *M. thermoautotrophicus* im Huhn generiert und wie unter II.8.4 beschrieben aufgereinigt worden waren. Vor dem Laden auf die Säule wurde die Antikörperlösung, genauso wie sämtliche verwendete Puffer filtriert (Poren-

größe 0,45 µm). Das Vorgehen bei der Aufreinigung entsprach den Herstellerangaben: Die Antikörper wurden 4 h bei 4°C auf der Säule inkubiert. Anschließend wurde diese zur Deaktivierung unbesetzter aktiver Gruppen sowie zum Entfernen ungebundenen Materials gewaschen. Dabei konnte die Effizienz der Kopplung über den A_{280} -Wert, gemessen am NanoDrop, bestimmt werden. Als Antigenlösung diente rekombinantes Protein, das wie unter II.5.3.1 beschrieben isoliert und anschließend gegen PBS (pH 7,4, siehe II.7.3.2) dialysiert wurde. Die Elution erfolgte in 500 µl Fraktionen entweder durch Absenkung des pH-Wertes auf 2,9 (0,1 M Glycin/HCl) oder Erhöhung auf pH 10 (0,1 M Glycin/NaOH). Sämtliche während der Aufreinigung gesammelten Fraktionen wurden über SDS-PAGE (siehe II.5.5) und Western Blot (siehe II.5.6) analysiert.

5.3.3 Dialyse

Die von der Nickelsäule eluierten Fraktionen wurden einer Dialyse gegen 5 mM HEPES (pH 7,5) unterzogen, wobei der Puffer mindestens dreimal gewechselt wurde. Bei den Dialyseschläuchen handelte es sich um Schlauchmembranen mit einer Molekülausschlussgrenze von 8-10 kDa bzw. 12-14 kDa. Vor ihrer Verwendung wurden sie wie unter II.5.1.6 beschrieben vorbehandelt. Im Falle der mit 8 M Harnstoff denaturierten Proteine fand eine stufenweise Dialyse gegen 5 mM HEPES statt, welches zunächst mit 2 M Harnstoff, dann mit 1 M Harnstoff versetzt worden war. Der letzte Dialyseschritt erfolgte gegen Dialysepuffer ohne Zusatz von Harnstoff. In allen Fällen wurde der pH auf 7,5 eingestellt. Diese stufenweise Dialyse war wichtig, um ein Ausfallen der Proteine während ihrer Renaturierung weitestgehend zu verhindern. Gänzlich vermieden werden konnte eine Ausflockung jedoch nie, weswegen die Präzipitate im Anschluss der Dialyse durch Zentrifugation entfernt werden mussten (15 min, 13.800 x g, Biofuge 13). Nach Bestimmung der Proteinkonzentration (siehe II.5.4) wurden alle während der Aufreinigung gesammelten Fraktionen mittels SDS-PAGE und Western Blot untersucht (siehe II.5.5 und II.5.6). Gegebenenfalls schloss sich eine Proteinbestimmung über Edman-Abbau bzw. MALDI-TOF MS/MS an (siehe II.5.9).

5.3.4 Abspaltung des His-Tags

Der His-Tag, der sich durch Klonierung und Expression im Vektor pET-14b am N-Terminus des rekombinanten Proteins befand, konnte über die Protease Thrombin abgespalten werden. Dies war wichtig für Polymerisationsstudien (siehe II.7) und Co-Immunpräzipitationen (siehe II.5.8.1), bei denen ein negativer Einfluss des His-Tags ausgeschlossen werden musste. Die Proteolyse erfolgte mithilfe des *Thrombin CleanCleave™ Kits* über Nacht bei Raumtemperatur. Dieser Kit hat den Vorteil, dass es zu keiner Verunreinigung der Probe kommt, da das Enzym an Agarose immobilisiert vorliegt. Der Erfolg der Spaltung konnte über SDS-PAGE (II.5.5) überprüft werden.

5.4 Bestimmung von Proteinkonzentrationen

Zur Bestimmung der Proteinkonzentration standen zwei Methoden zur Verfügung. In der Regel wurde sie photometrisch am NanoDrop aus der Absorption bei 280 nm ermittelt. War die Proteinmenge nicht begrenzt und eine genauere Quantifizierung erforderlich, so konnte die Konzentration mittels *Roti® Nanoquant*, einer modifizierten Methode nach Bradford (1976), bestimmt werden. Dazu wurde zunächst eine Eichgerade mit BSA-Lösungen verschiedener Konzentrationen nach Herstellerangaben erstellt. Die Absorptionen bei 450 nm und 590 nm wurden am Photometer (Genesys 5) erfasst, wobei $\text{H}_2\text{O}_{\text{millipore}}$ als Referenz diente. Der Quotient aus A_{590}/A_{450} wurde ermittelt und gegen die eingesetzte BSA-Konzentrationen aufgetragen. Analog wurde mit den Proben verfahren, die meist verdünnt eingesetzt wurden. Die Proteinmenge konnte anhand der Eichgerade abgelesen und nach Berücksichtigung des Verdünnungsfaktors bestimmt werden.

5.5 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Proteine wurden auf Polyacrylamidgelen entweder entsprechend dem System nach Laemmli (1970) oder nach Schägger und Jagow (1987) aufgetrennt, wobei letzteres bei der Untersuchung kleiner Proteine vorgezogen wurde. Die Herstellung der Gele erfolgte nach dem gleichen Schema, die Trenngel-, Sammelgel- und Laufpuffer unterschieden sich jedoch.

5.5.1 Herstellung der Gele

Zur Herstellung von Minigelen (95 x 75 x 1 mm) wurde zunächst das Trenngel in der benötigten Prozentigkeit gegossen und mit Isopropanol überschichtet. Nach Auspolymerisierung wurde das Isopropanol abgezogen, das Sammelgel aufgebracht und mit einem Kunststoffkamm versehen. Mit erfolgter Auspolymerisierung konnte das Gel verwendet werden.

Substanz	Trenngel 10 %	Trenngel 12,5 %	Sammelgel 4,5 %
$\text{H}_2\text{O}_{\text{millipore}}$	2,5 ml	2,0 ml	1,2 ml
Acrylamid/Bisacrylamid 30 %	2,0 ml	2,5 ml	300 μl
Trenngelpuffer	1,5 ml	1,5 ml	---
Sammelgelpuffer	---	---	500 μl
APS 10 % (w/v)	30 μl	30 μl	15 μl
TEMED	5 μl	5 μl	3 μl

5.5.2 Diskontinuierliche SDS-PAGE nach Laemmli (1970)

Sammelgelpuffer, pH 6,8		Trenngelpuffer, pH 8,8	
Tris/HCl	0,5 M	Tris/HCl	1,5 M
SDS	0,4 % (w/v)	SDS	0,4 % (w/v)
Der pH wurde auf 6,8 eingestellt.		Der pH wurde auf 8,8 eingestellt.	
Laufpuffer, pH 8,5			
Tris/HCl	25 mM		
Glycin	200 mM		
SDS	0,1 % (w/v)		
Der pH wurde auf 8,5 eingestellt.			

5.5.3 Diskontinuierliche SDS-PAGE nach Schagger und Jagow (1987)

Sammelgelpuffer, pH 6,8	
Tris/HCl	0,5 M
Der pH wurde auf 6,8 eingestellt.	
Kathodenlaufpuffer, pH 8,3	
Tris/HCl	100 mM
Tricin	100 mM
SDS	0,1 % (w/v)
Der pH wurde auf 8,3 eingestellt.	

Trenngelpuffer, pH 8,8	
Tris/HCl	1,5 M
Der pH wurde auf 8,8 eingestellt.	
Anodenlaufpuffer, pH 8,8	
Tris/HCl	200 mM
Der pH wurde auf 8,8 eingestellt.	

5.5.4 Probenvorbereitung und Elektrophoresebedingungen

2x Auftragspuffer, pH 7,5	
Tris/HCl	60 mM
Glycerin	10 % (v/v)
β -Mercaptoethanol	10 % (v/v)
SDS	2 % (w/v)
Bromphenolblau	0,01 % (w/v)
Der pH wurde auf 7,5 eingestellt. Der Auftragspuffer wurde als Stammlösung ohne β -Mercaptoethanol hergestellt und bei 4°C aufbewahrt.	

Alle Proben wurden im Vorfeld der elektrophoretischen Auftrennung im Verhältnis 1:1 mit Auftragspuffer versetzt und 10 min im Wasserbad bei 100°C denaturiert. Eine Ausnahme bildeten hierbei lediglich die Ansätze der Polymerisationsstudien, bei denen der Auftragspuffer modifiziert und auf ein Aufkochen verzichtet wurde (siehe II.5.7).

Die Auftrennung der Proteine erfolgte in der Minigel-Twin-Apparatur zunächst für 10 min bei 15 mA um die Proben im Sammelgel zu konzentrieren. Anschließend wurde der Lauf bei einer Stromstärke von 30 mA fortgesetzt, bis die Bromphenolblau-Lauffront die Gelkante erreichte.

5.5.5 Färbung von SDS-Gelelen

Nach der gelelektrophoretischen Auftrennung der Proteine wurden die SDS-Gele mit einer der nachfolgenden Methoden gefärbt. Dabei wurden alle Schritte unter Schütteln bei Raumtemperatur durchgeführt.

Coomassie-Färbung

Färbelösung		Entfärber	
Coomassie Brilliant Blue G250	0,2 % (w/v)	Methanol	30 % (v/v)
Methanol	30 % (v/v)	Essigsäure	10 % (v/v)
Essigsäure	10 % (v/v)		

Über eine Färbung mit Coomassie konnten Proteine bis zu einer Detektionsgrenze von ca. 400 ng Protein pro cm² nachgewiesen werden. Das Gel wurde 30 min in Färbelösung geschwenkt und anschließend unter mehrmaligem Wechsel des Entfärbers bis zum gewünschten Grad entfärbt.

Silberfärbung

Gegenüber der klassischen Coomassiefärbung ist die Silberfärbung um den Faktor 40 sensitiver (Blum *et al.*, 1987, Proteinnachweisgrenze im Gel 10 ng/cm²). Coomassie-gefärbte Gele konnten nach vollständiger Entfärbung einer nachträglichen Silberfärbung unterzogen werden. Dabei wurde nach folgendem Protokoll vorgegangen:

Schritt	Substanz	Konzentration	Dauer
Fixieren	Methanol	50 % (v/v)	30 min
	Essigsäure	10 % (v/v)	
Waschen	Ethanol	50 % (v/v)	10 min
Waschen	Ethanol	10 % (v/v)	10 min
Blockieren	Natriumthiosulfat	0,02 % (w/v)	1 min
Waschen	H ₂ O _{millipore}		3 x 20 s
Färben	Silbernitrat	0,1 % (w/v)	20 min
	Formaldehyd	0,027 % (v/v)	
Waschen	H ₂ O _{millipore}		2 x 20 s
Entwickeln	Natriumcarbonat	6 % (w/v)	bis Banden sichtbar
	Formaldehyd	0,018 % (v/v)	
Stoppen	Essigsäure	10 % (v/v)	30 min

5.5.6 Trocknung von SDS-Gelen

Geltrocknungslösung	
Ethanol	22 % (v/v)
Glycerin	2 % (v/v)
Isopropanol	1 % (v/v)

Zur dauerhaften Aufbewahrung wurden die gefärbten Gele mithilfe des Geltrocknungssystems *DryEase™ Mini Cellophane* konserviert. Zu diesem Zweck wurden die Gele bei Raumtemperatur für 30 min in Geltrocknungslösung geschwenkt, bevor sie in einen speziellen Rahmen zwischen zwei Cellophanfolien gespannt und über Nacht getrocknet wurden.

5.6 Western Blot

5.6.1 Transfer der Proteine auf PVDF-Membran (Towbin *et al.*, 1979)

Towbin-Transferpuffer, pH 8-9	
Tris	48 mM
Glycin	39 mM
Methanol p.a.	20 % (v/v)
Der pH 8-9 ergibt sich. Der Puffer wurde stets frisch hergestellt und eiskalt verwendet.	
Modifizierter Towbin-Transferpuffer, pH 10,5	
Tris	48 mM
Glycin	39 mM
Methanol p.a.	10 % (v/v)
Der pH wurde mit 5 M NaOH auf 10,5 eingestellt. Der Puffer wurde stets frisch hergestellt und eiskalt verwendet.	

Nach erfolgter elektrophoretischer Auftrennung der Proteine konnten diese über die SemiDry-Elektroblot-Methode auf eine Polyvinylidendifluorid-(PVDF)-Membran übertragen werden. Hierfür wurde die auf Gelgröße zugeschnittene Membran zur Hydrophilisierung 1 min in Methanol p.a. geschwenkt. Anschließend wurde die Membran zusammen mit sechs ebenso zurechtgeschnittenen Whatman-Papieren für 30 min, das SDS-Gel dagegen für 15 min in eiskaltem Towbin-Transferpuffer äquilibriert. Für besonders basische Proteine, wie Mth59, wurde ein modifizierter Towbin-Transferpuffer entwickelt, bei dem der Gehalt an Methanol auf 10 % (v/v) reduziert und der pH auf 10,5 eingestellt wurde.

Die Whatman-Papiere, das SDS-Gel und die PVDF-Membran wurden nach Herstellerangaben luftblasenfrei in die Transferapparatur geschichtet. Die Proteine wurden darin bei einer konstanten Spannung von 13 V und einer Dauer von ca. 45 min auf die Membran geblottet. Das Gelingen des Transfers wurde durch die Übertragung des Prestained Protein Markers nachvollzogen. Ferner konnten die Proteine auf der Membran über Färbung mit Ponceau S (siehe II.5.6.2) nachgewiesen werden. Der Western Blot diente entweder der

immunologischen Detektion mittels adäquater Antikörper (siehe II.5.6.3) oder einer Protein-identifizierung über Edman-Abbau (siehe II.5.9.1).

5.6.2 Färbung mit Ponceau S

Färbelösung	
Ponceau S	2 % (w/v)
Trichloressigsäure	3 % (v/v)

Die Färbung mit Ponceau S diente einer schnellen und reversiblen Überprüfung des elektrischen Proteintransfers von einem SDS-Gel auf eine PVDF-Membran und konnte im Vorfeld eines immunologischen Nachweises durchgeführt werden. Dazu wurde die Membran 10 min in Färbelösung geschwenkt. Die Entfärbung erfolgte in $\text{H}_2\text{O}_{\text{millipore}}$. Ein zusätzlicher Vorteil der Ponceau-Färbung lag darin, dass die Proteine durch die Säure auf dem Blot fixiert wurden.

5.6.3 Immunologischer Nachweis

TBS-T, pH 7,6	
Tris/HCl	20 mM
NaCl	137 mM
Tween 20	0,1 % (v/v)

Der pH wurde mit $\text{HCl}_{\text{konz.}}$ auf 7,6 eingestellt.

Die auf eine PVDF-Membran übertragenen Proteine wurden über spezifische Antikörper nachgewiesen. Dazu wurde die Membran zur Absättigung unspezifischer Bindungsstellen mindestens vier Stunden in TBS-T-Puffer mit 10 % (w/v) Magermilchpulver geschwenkt. Daran schloss sich eine mindestens vierstündige Inkubation der Membran mit dem primären Antikörper an, welcher entsprechend in TBS-T mit 3 % (w/v) Magermilchpulver verdünnt worden war. Bei diesem Primärantikörper handelte es sich um einen unmarkierten, antigenspezifischen Antikörper. Es folgten zwei zehnminütige Waschschrte in TBS-T-Puffer zur Entfernung nicht gebundener Antikörper. Der Peroxidase-gekoppelte, speziesspezifische Sekundärantikörper wurde 1:2.000 in TBS-T mit 3 % (w/v) Magermilchpulver verdünnt und für eine Stunde auf die Membran gegeben. Überschüssige sekundäre Antikörper, die nicht an Primärantikörper gebunden hatten, wurden durch dreimaliges Schwenken der Membran in TBS-T abgewaschen.

Die Detektion beruhte auf einer durch die Peroxidase katalysierten Oxidation von 3-Amino-9-Ethylcarbazol, welche mit einer Rotfärbung einherging. Zu diesem Zweck wurden 20 mg der Substanz in 1 ml Ethanol p.a. gelöst und zu 50 ml 20 mM Kaliumacetatlösung (pH 5,0) gegeben. Die ausgeflockte Lösung wurde über einen Faltenfilter von unlöslichen Bestandteilen getrennt und mit 100 μl 10 %igem (v/v) Triton X-100 versetzt. Kurz vor Beginn der Detektion erfolgte die Zugabe von 10 μl H_2O_2 . Die Membran wurde in dieser Lösung solange geschwenkt, bis rötlich-braune Banden sichtbar wurden. Durch dreimaliges Waschen mit

H₂O_{millipore} wurde die Reaktion gestoppt und die Membran anschließend lichtgeschützt getrocknet.

5.7 Polymerisationsstudien

Polymerisationsstudien sollten zeigen, ob rekombinant erzeugtes Mth60 *in vitro* zur spontanen Bildung von Fimbrien fähig ist. Um die bestmöglichen Bedingungen für eine potentielle Polymerisation zu ermitteln, wurden mehrere Ansätze parallel bei verschiedenen Temperaturen (8°C, RT, 37°, 45°, 55°, 65°, 75°, 85° und 95°C) für unterschiedliche Zeiträume (in der Regel 1 Tag, 3 Tage und 7 Tage) inkubiert. Die Polymerisationsansätze wurden entsprechend folgendem Schema in Protein LoBind Tubes pipettiert:

Substanz	Menge
aufgereinigtes Mth60 (ca. 0,15 mg/ml)	47 µl
MgCl ₂ (1M)	1 µl
CaCl ₂ (1M)	1 µl
NaN ₃ (100 mM)	1 µl

Die Studien erfolgten bei einem pH von 7, was dem optimalen pH-Wert zur Kultivierung von *M. thermoautotrophicus* entspricht. Dieser wurde über pH-Indikatorpapier ermittelt, welches dazu in fünf gleich große Streifen geschnitten wurde, so dass 3 µl Probe für das Testen ausreichen. Gegebenenfalls konnte der pH mit NaOH bzw. H₂SO₄ korrigiert werden. Die Zugabe von Natriumazid (NaN₃) sollte ein Wachstum von Fremdorganismen während der Inkubationsphase verhindern.

Um bei der elektronenmikroskopischen Analyse Artefakte auszuschließen, die auf die Pufferlösung zurückzuführen sind, wurde stets eine Kontrolle mitgeführt, bei der die Proteinlösung durch Puffer ersetzt wurde. Ansätze, die bei Temperaturen über 65°C inkubiert wurden, mussten vor einem Verdunsten der Probe geschützt werden. Es wurde versucht, dies durch Überschichtung mit Mineralöl, sowie durch Inkubation des Reaktionsgefäßes in einer Druckflasche mit 2 bar Überdruck, zu erreichen.

Zusätzlich zu Temperatur und Inkubationsdauer sollten auch die Einflüsse von zweiwertigen Ionen und des putativen Chaperons Mth59 untersucht werden. Im ersten Fall wurden Ansätze pipettiert, denen im Gegensatz zu dem oben aufgeführten Schema entweder keinerlei zweiwertige Ionen oder aber jeweils nur Mg²⁺ bzw. Ca²⁺ beigefügt wurden. Die Auswirkung des Mth59 auf die Polymerisationsfähigkeit von Mth60 wurde durch die Zugabe des rekombinanten, aufgereinigten und dialysierten Proteins (siehe II.5.3) in verschiedenen Verhältnissen (Mth59:Mth60 von 1:1, 1:100, 1:1.000 und 1:2.000) überprüft. Um einen negativen Effekt des His-Tags am N-Terminus von Mth59 auszuschließen, konnte dieser im Vorfeld mit Thrombin abgespalten werden (siehe II.5.3.4).

Nach Ablauf der jeweiligen Inkubationszeit wurden alle Ansätze sowohl elektronenmikroskopisch, über die Analyse von Suspensionspräparaten (siehe II.7.1), als auch protein-

biochemisch, über SDS-PAGE (siehe II.5.5) und Western Blots (siehe II.5.6) untersucht. Dabei wurde im Falle einer proteinbiochemischen Analyse auf eine Hitzedenaturierung der Proteine im Vorfeld der elektrophoretischen Auftrennung verzichtet. Weiterhin wurde ein Auftragspuffer ohne β -Mercaptoethanol verwendet, der zudem einen reduzierten SDS-Anteil von nur 0,5 % (w/v) aufwies.

5.8 Untersuchung von Protein-Protein-Interaktionen

5.8.1 Co-Immunpräzipitation

Co-Immunpräzipitationen wurden herangezogen, um die putative Chaperon-Funktion des Proteins Mth59 zu untersuchen. Über immobilisierte anti-Mth59 Antikörper sollte das Antigen zusammen mit eventuell daran gebundenen Proteinen aufgereinigt werden. Dazu wurden zum einen Versuche mit einem *M. thermoautotrophicus*-Zellaufschluss angesetzt, zum anderen wurden die rekombinant erzeugten Proteine Mth59 und Mth60 verwendet, um eine mögliche Interaktion aufzudecken. In diesem Fall konnten die Ergebnisse auch durch die Verwendung immobilisierter Antikörper, die gegen die Mth60-Fimbrien generiert worden waren (siehe II.8.2), verifiziert werden.

Die Experimente wurden mit dem *Direct IP Kit* durchgeführt. Das Prinzip bei der Herstellung der Säulen zur Affinitätschromatographie beruht auf einer reduktiven Aminierung. Dabei gehen die Aldehyd-aktivierten Agarose-Beads eine kovalente Bindung mit den primären Aminen der Antikörper ein, wodurch diese am Säulenmaterial immobilisiert werden. Die dabei gebildete Schiff'sche Base zwischen Aldehyd und Amin wird über das schwache Reduktionsmittel Natriumcyanoborohydrid (NaCNBH_3) stabilisiert. Die Bindung bleibt auch während der Elution mittels pH-Shift stabil, wodurch allein die Antigene, nicht jedoch die Antikörper eluiert werden. Dies war für die nachfolgende Analyse über SDS-PAGE (siehe II.5.5) besonders wichtig, da Mth59 eine Molekularmasse ähnlich der leichten Ketten der Antikörper aufweist. Die Detektion und Identifizierung der eluierten Proteine erfolgte ferner über Western Blot (II.5.6).

Pro Versuchsansatz wurde stets eine Säule mit einer im Kit enthaltenen Negativkontrolle mitgeführt. Dabei handelte es sich um Agarose-Beads, die nicht mit primären Aminen zu reagieren vermochten, so dass eine Bindung der Antikörper ausblieb. Da die Versuche entsprechend den Herstellerangaben und unter Verwendung der mitgelieferten Puffer durchgeführt wurden, wird im Folgenden nur kurz auf die einzelnen Schritte eingegangen.

5.8.1.1 Bindung der Antikörper an das Säulenmaterial

Zur Herstellung der Säulen wurden 20 μl Agarose-Suspension in die dafür vorgesehenen Röhrchen pipettiert und durch Zentrifugation pelletiert. Die Beads wurden durch zweimaliges Waschen gereinigt und anschließend mit 10 μg Antikörper (siehe II.8) versetzt. Die zweistündige Inkubation erfolgte in einem Über-Kopf-Schüttler bei Raumtemperatur. Nach einigen

weiteren Wasch- und Inkubationsschritten konnten die Säulen für die Co-Immunpräzipitation eingesetzt werden.

5.8.1.2 Vorbereitung der Proteinlösungen

Der Zellausschluss wurde wie unter II.5.2 beschrieben über Behandlung mit dem FastPrep-Homogenisator hergestellt. Nach Zentrifugation zur Pelletierung der größeren Zellbestandteile wurde die Proteinkonzentration der Lösung bestimmt (siehe II.5.4) und etwa 1000 µg in die Co-Immunpräzipitation eingesetzt.

Für die Experimente mit rekombinant erzeugten Proteinen wurden Mth59 und Mth60 nach Aufreinigung und Dialyse (siehe II.5.3) im Verhältnis 1:1 gemischt und über Nacht bei Raumtemperatur im Über-Kopf-Schüttler unter sanften Bedingungen inkubiert. Dies sollte eine Interaktion der Proteine miteinander ermöglichen. Die dabei eingesetzten Mengen betrugen je 30 bis 50 µg. Um einen negativen Einfluss des His-Tags am N-Terminus von Mth59 auszuschließen, konnte dieser wie unter II.5.3.4 beschrieben im Vorfeld mit Thrombin abgespalten werden. Zur Kontrolle, ob es zu einer spezifischen Interaktion zwischen Mth59 und Mth60 kam, wurden auch Ansätze angefertigt, bei denen Lysozym bzw. BSA anstelle des Fimbrins Mth60 eingesetzt wurden.

5.8.1.3 Durchführung der Co-Immunpräzipitation und Elution

Die mit immobilisierten Antikörpern versehenen Säulchen wurden mit maximal 600 µl Proteinlösung beladen. Die Inkubation erfolgte über Nacht im Über-Kopf-Schüttler bei 4°C. Nach insgesamt fünf Waschschritten zur Entfernung des nicht gebundenen Materials erfolgte die Elution in 75 µl Elutionspuffer (pH 2,8). Zur Neutralisierung des pH-Wertes wurden in den Reaktionsgefäßen 5 µl 1 M Tris/HCl (pH 9,0) vorgelegt. Es wurden stets drei Elutionsfraktionen gesammelt.

5.8.2 Gelfiltrations-Chromatographie

Die Gelfiltrations-Chromatographie (SEC: Size Exclusion Chromatography) stellte eine weitere Möglichkeit dar, Protein-Protein-Interaktionen zu analysieren. Die Methode basiert auf einer Trennung der Moleküle entsprechend ihrer Größe in Lösung, bzw. genauer gesagt, entsprechend ihrem hydrodynamischen Volumen. Dabei ist die Säulenmatrix so porös, dass große Moleküle schneller eluiert werden als kleine, die durch das Eindringen in die Poren der Matrix einen entsprechend längeren Laufweg haben. Vor diesem Hintergrund sollten rekombinant erzeugtes Mth59 und Mth60 zum einen getrennt, zum anderen nach Mischung und Inkubation analog zu II.5.8.1.2 auf die Säule geladen und die jeweiligen Elutionszeitpunkte analysiert werden.

Die Chromatographie wurde mit einer Superdex 75 10/300 GL Säule an der ÄKTA bei 4°C durchgeführt. Der Gelfiltrationspuffer entsprach dem Puffer, in dem die rekombinanten Proteine vorlagen (5 mM HEPES, pH 7,5), der jedoch zusätzlich mit 200 mM NaCl und

10 %igem (v/v) Glycerin versetzt worden war. Zur Entfernung von Schwebeteilchen, die die Pumpen verstopfen könnten, wurde der Puffer vor der Verwendung über einen Filter mit einer Porengröße von 0,45 µm mithilfe der Wasserstrahlpumpe filtriert. Die Äquilibration der Säule erfolgte mit mindestens zwei Säulenvolumen Gelfiltrationspuffer. Anschließend wurden 250 µl der Probe über eine Probenschleife aufgetragen und bei einem Fluss von 0,5 ml/min eluiert. Die installierte UV-Lampe konnte die Proteinpeaks erfassen. Die Säule wurde zum Schluss mit ca. drei Säulenvolumen filtriertem H₂O_{millipore} gewaschen und anschließend in 20 %igem (v/v) Ethanol gelagert.

5.9 Identifizierung von Proteinen

5.9.1 N-terminale Sequenzierung über Edman-Abbau

Um Proteine über eine N-terminale Sequenzierung nach Edman (Edman, 1950) identifizieren zu können, mussten diese nach dem Elektrotransfer auf eine PVDF-Membran (siehe II.5.6.1) mit Coomassie angefärbt werden. Zu diesem Zweck wurde die Membran 10 min in Coomassie-Färbelösung (siehe II.5.5.5) inkubiert. Die Entfärbung fand in 30 %igem (v/v) Ethanol bis zum Erscheinen der Banden statt. Im Anschluss wurde die Membran über Nacht in H₂O_{millipore} gewaschen. Die Banden wurden mit einem Einmalskalpell ausgeschnitten und von Eduard Hochmuth (Labor Prof. Deutzmann) vom Lehrstuhl für Biochemie an der Universität Regensburg analysiert. Die erhaltenen N-terminalen Aminosäuresequenzen wurden mit den vorhandenen Genomdaten abgeglichen und bioinformatisch ausgewertet (II.5.10).

5.9.2 Proteolytischer in-Gel-Verdau und MALDI-TOF MS/MS

Im Vorfeld der Proteinsequenzierung über MALDI-TOF (Matrix assisted laser desorption/ionisation-time of flight) Tandem-MS (Tandem-Massenspektrometrie, kurz MS/MS) (Tanaka *et al.*, 1988) wurden die Proben elektrophoretisch über eine SDS-PAGE nach Laemmli (siehe II.5.5) aufgetrennt, mit Coomassie gefärbt (siehe II.5.6.1) und anschließend mehrere Stunden in 7 %iger (v/v) Essigsäure entfärbt. Das Gel wurde über Nacht in H₂O_{millipore} geschwenkt, die zu bestimmenden Proteinbanden mithilfe eines Einmalskalpells ausgeschnitten und nach Abschätzung ihres Gelvolumens in kleine Würfel mit ca. 1 mm Kantenlänge zerkleinert. Die kleingeschnittenen Banden wurden in 2 ml Eppendorf-Reaktionsgefäße überführt und unter sanftem Schütteln nacheinander je 30 min in 750 µl der folgenden Waschlösungen inkubiert:

- 1) 50 mM NH₄HCO₃
- 2) 50 mM NH₄HCO₃ / 25 % (v/v) Acetonitril
- 3) 25 % (v/v) Acetonitril
- 4) 50 % (v/v) Acetonitril

Nach dem Entfernen der letzten Lösung wurden die Gelwürfel etwa 5 h bei geöffnetem Deckel unter der Sterilbank bis zu ihrer vollständigen Trocknung gelagert. Der proteolytische Verdau erfolgte mit 0,2 µg Protease (Trypsin, Chymotrypsin, V8-Endoproteinase Glu-C;

jeweils sequencing grade) pro 10 µl Gelvolumen. Die lyophilisierten Proteasen wurden hierzu nach Herstellerangaben resuspendiert und für den Verdau in 50 mM NH_4HCO_3 verdünnt. Es war darauf zu achten, dass der eingesetzte Puffer das 1,5-fache des Gelvolumens betrug und dieser in zwei Portionen zugegeben wurde, wobei die erste Portion die gesamte Proteasemenge enthalten sollte. Der Verdau wurde über Nacht in einem Brutschrank bei 37° (Trypsin) bzw. 25°C (Chymotrypsin, V8-Endoproteinase) durchgeführt. Die entstandenen Peptide wurden aus der Gelmatrix durch zweistündige Inkubation unter leichtem Schütteln in folgenden Lösungen extrahiert:

- 1) 100 mM NH_4HCO_3
- 2) 100 mM NH_4HCO_3
- 3) 100 mM NH_4HCO_3 / 50 % (v/v) Acetonitril

Dabei betrugen die eingesetzten Mengen das 2,5-fache des Gelvolumens. Alle Extraktionsfraktionen wurden in einem 0,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß vereinigt und an Eduard Hochmuth vom Labor Prof. Deutzmann der Universität Regensburg für die Sequenzierung mittels MALDI-TOF MS/MS übergeben. Anhand der bei der Analyse erhaltenen, typischen Fragmentierungsmuster konnten Rückschlüsse auf die Peptidsequenzen gezogen werden, die, wie unter II.5.10 beschrieben, ausgewertet wurden.

5.9.3 LC/MS

Die Identifizierung der Proteine, die in den Fraktionen der isolierten und aufgereinigten Fimbrien (siehe II.5.1) enthalten waren, sollte zusätzlich zu MALDI-TOF MS/MS auch über LC/MS, einer Kopplung aus Flüssigchromatographie (LC, liquid chromatography) und Massenspektrometrie (MS) stattfinden. Zu diesem Zweck wurden bis zu 30 µl der Fimbrienlösung zunächst 30 min bei 80°C inkubiert, kurz bei Raumtemperatur abgekühlt und mit 0,8 µg Trypsin (in 30 µl 50 mM NH_4HCO_3) versetzt. Nach einstündiger Inkubation bei 55°C erfolgte eine erneute Zugabe von 0,8 µg der in Puffer verdünnten Protease. Anschließend wurde der Ansatz über Nacht bei 42°C inkubiert. Der Erfolg des Verdau konnte über SDS-PAGE überprüft werden. Die Proben wurden von Eduard Hochmuth vom Lehrstuhl für Biochemie der Universität Regensburg (Labor Prof. Dr. Deutzmann) analysiert. Zunächst wurden die entstandenen Peptide über nano-HPLC (High Pressure Liquid Chromatography) aufgetrennt und auf eine spezielle Platte gespottet. Die sich anschließende massenspektrometrische Analyse diente der Identifizierung der Peptide. Diese Shotgun-Methode lieferte keine Information über Anzahl und jeweilige Menge der enthaltenen Proteine.

5.10 Bioinformatische Analysen

Im Rahmen dieser Arbeit wurden verschiedene Datenbanken und Algorithmen zur Auswertung von Proteinsequenzen herangezogen. Die phylogenetische Zuordnung von Aminosäuresequenzen, die durch Edman-Abbau bzw. Massenspektrometrie (siehe II.5.9) erhalten wurden, erfolgte unter Verwendung des Protein Blast Tools der Datenbank NCBI

(National Center for Biotechnology Information, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Dieses Tool wurde auch bei der Suche nach verwandten Proteinen eingesetzt. Ferner wurde auch HHpred (Söding *et al.*, 2005), ein empfindlicher Server zur Aufdeckung weit entfernter Homologien verwendet. Molekularmassen und isoelektrische Punkte wurden mithilfe des Programms ProtParam (Gasteiger *et al.*, 2005) berechnet. Für die Vorhersage von Transmembrandomänen kamen die Programme Phobius (Käll *et al.*, 2004) und TMHMM 2.0 (Krogh *et al.*, 2001) zum Einsatz. Phobius ermöglichte zudem die Aussage über ein potentiell Signalpeptid innerhalb der untersuchten Proteinsequenz. Weitere Algorithmen zur Vorhersage von Signalpeptiden stellten Pred-Signal (Bagos *et al.*, 2009) und SignalP 4.0 (Petersen *et al.*, 2011) dar. NetNGlyc 1.0 (Gupta und Brunak, 2002) wurde zur Bestimmung potentieller N-Glykosylierungsstellen verwendet, das Programm NetOGlyc 3.0 (Julenius *et al.*, 2005) ermöglichte die Suche nach O-Glykosylierungsstellen innerhalb der Aminosäuresequenz. Die Vorhersage von dreidimensionalen Proteinstrukturen wurde mit dem Programm Phyre 0.2 (Bennett-Lovsey *et al.*, 2008; Kelley und Sternberg, 2009) durchgeführt, wobei die möglichen Ligandenbindestellen anschließend von 3DLigandSite (Wass *et al.*, 2010) vorausgesagt werden konnten. PSORTb 3.0.2 (Yu *et al.*, 2010) diente zur Einschätzung der subzellulären Lokalisation von Proteinen.

6 Mikroskopie

6.1 Phasenkontrastmikroskopie

Die Lichtmikroskopie diente in erster Linie der Zellzahlbestimmung von *Methanothermobacter*-Zellen und der Überprüfung von Zellaufschlüssen. Sie erfolgte an den Phasenkontrastmikroskopen Nikon Labophot-2 und Olympus CX31. Es wurden 10-fach Okulare und Objektive in 40- (Luftobjektiv) und 100-facher (Ölimmersionsobjektiv) Vergrößerung verwendet. Zur photographischen Dokumentation wurde die am Olympus CX31 fest installierte Kamera (Microscope Digital Camera DP21) verwendet.

Die Gesamtzellzahl wurde mithilfe einer Thoma-Zählkammer (Volumen pro Kleinstquadrat 0,02 mm x 0,0025 mm²) in Verbindung mit einem 40-fach vergrößernden Objektiv über folgende Formel bestimmt:

$$\text{Zellzahl pro ml} = (\text{durchschnittliche Zellzahl pro Kleinstquadrat}) \times 2 \times 10^7$$

6.2 Transmissionselektronenmikroskopie (TEM)

Transmissionselektronenmikroskopische Untersuchungen wurden am TEM Phillips CM12 durchgeführt. Die durch eine LaB₆-Kathode erzeugten Elektronen wurden mit einer Spannung von 120 kV im Hochvakuum beschleunigt. Die digitale Fotodokumentation erfolgte mittels einer Slow-Scan-CCD-Kamera in Verbindung mit dem Microsoft Windows[®] gestützten Anwendungsprogramm EM-Menü 4.0.

6.3 Rasterelektronenmikroskopie (REM)

Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen wurden von Prof. Dr. Gerhard Wanner am Biozentrum der LMU München in Martinsried an einem Hitachi S-4100 durchgeführt. Untersucht wurden dabei *M. thermoautotrophicus*-Zellen, die auf festen Oberflächen angewachsen waren (siehe II.2.1.5). Von besonderem Interesse waren dabei die Zellanhänge, genauer gesagt eventuell vorhandene „End-Strukturen“ der Fimbrien. Zu diesem Zweck mussten Zellen und Zellanhänge fixiert werden. Da die optimalen Bedingungen im Falle der Fimbrien nicht bekannt waren, wurden zwei verschiedene Methoden getestet. Einerseits wurden die bewachsenen Oberflächen den Serumflaschen entnommen, kurz in $\text{H}_2\text{O}_{\text{millipore}}$ geschwenkt und in Fixanslösung (50 mM HEPES, 2,5 % (v/v) Glutardialdehyd in $\text{H}_2\text{O}_{\text{millipore}}$, pH 6,5) überführt. Die zweite Variante bestand darin, die Oberflächen noch in den Serumflaschen durch Zuspritzen von HEPES und Glutardialdehyd in den oben genannten Endkonzentrationen für 20 min zu fixieren. Anschließend wurden die Oberflächen in ein Reaktionsgefäß überführt und mit dem Überstand aus den Serumflaschen überschichtet. Die so fixierten Proben wurden gekühlt zu Prof. Wanner geschickt, wo die weitere Präparation der Objekte erfolgte.

7 Elektronenmikroskopische Präparationstechniken

7.1 Herstellung und Kontrastierung von Suspensionspräparaten

Uranylacetat-Lösung, pH 4	
UAc	2 % (w/v)
Essigsäure	0,1 % (v/v)
Der pH von 4 ergibt sich.	

Zur Herstellung von Suspensionspräparaten mussten kohlebeschichtete Kupfer-Grids (400 square mesh) zunächst in einem Plasma Cleaner hydrophilisiert werden. Anschließend wurden ca. 5 μl der Probe aufgetragen und 1 min inkubiert, bevor die Flüssigkeit mit einem Filterpapier abgenommen wurde. Sollte die Probe konzentriert werden, so konnte dieser Schritt mehrmals wiederholt werden. Handelte es sich um eine unreine Probe, wurden ein bis zwei kurze Waschschrte mit $\text{H}_2\text{O}_{\text{millipore}}$ angeschlossen. Unmittelbar danach erfolgte eine Schwermetall-Kontrastierung mit einem Tropfen Uranylacetat-Lösung für ca. 45 s. Nach Abziehen des Uranylacetats wurden die Grids luftgetrocknet und im TEM analysiert.

Auch die auf Gold-Grids gewachsenen Organismen (siehe II.2.1.5) konnten auf diese Weise kontrastiert werden. Dazu wurden die Serumflaschen geöffnet, die Grids aus den Teflonhaltern entfernt und vor der Kontrastierung kurz in MS-Waschpuffer (siehe II.2.1.1) gewaschen.

7.2 Herstellung von Ultradünnschnitten

Ultradünnschnitte von in Kunstharz eingebetteten *M. thermoautotrophicus*-Zellen sollten – nach entsprechender Immunmarkierung – einen Einblick in die zelluläre Verteilung von Mth60 und Mth59 ermöglichen. Zu diesem Zweck wurden die Zellen hochdruckgefroren, gefriersubstituiert und in Epon eingebettet. Die genannten Arbeiten wurden freundlicherweise von Christine Meese, vom Lehrstuhl für Molekulare und Zelluläre Anatomie (Prof. Witzgall) der Universität Regensburg, durchgeführt.

7.2.1 Probenvorbereitung und High Pressure Freezing (HPF)

Das Hochdruckgefrieren diene dem Ziel einer bestmöglichen Strukturhaltung der Zellen. Durch hohe Abkühlraten von 20.000 K/s bei einem Druck von etwa 2.000 bar wird eine Eiskristallbildung und eine damit verbundene Umverteilung, Denaturierung und Aggregation der Zellbestandteile vermieden.

Planktonische Zellen, die über Hochdruckgefrierung kryofixiert werden sollten, wurden zunächst schonend durch Zentrifugation bei geringer Umdrehungszahl pelletiert und in einem kleinen Volumen des Überstandes resuspendiert. 1,5 µl dieser Zellsuspension wurden auf einen Goldträger (200 µm Tiefe) pipettiert, in den zugehörigen Präparatehalter eingespannt und in die Probenschleuse des Hochdruckgefrierers EM PACT2 eingebracht. Der Einfriervorgang erfolgte innerhalb von Millisekunden. Um eine Rekristallisierung des intrazellulären Wassers zu verhindern, wurden die Proben anschließend in flüssigem Stickstoff gelagert.

Da vor allem Zellanhänge durch die Zentrifugation beschädigt werden konnten, wurden parallel auch in Cellulosekapillaren kultivierte Organismen (siehe II.2.1.5) hochdruckgefroren. Nach der Entnahme aus den Serumflaschen wurden die Kapillaren zunächst lichtmikroskopisch auf Bewuchs kontrolliert und in eine Petrischale mit 1-Hexadecen überführt. Die Kapillaren wurden mit einem speziellen Skalpell in ca. 1 mm lange Stücke geschnitten. Je drei dieser Kapillarenstücke wurden in die Aussparung eines Goldträgers gelegt und wie zuvor beschrieben hochdruckgefroren.

7.2.2 Gefriersubstitution

Substitutionslösung	
Aceton	92,75 % (v/v)
Glutardialdehyd	2 % (v/v)
Uranylacetat	0,25 % (w/v)
H ₂ O _{millipore}	5 % (v/v)

Die Gefriersubstitution diene dazu, das intrazelluläre Wasser der kryofixierten Präparate gegen ein organisches Lösungsmittel zu ersetzen, das mit dem unpolaren Einbettungsreagenz Epon mischbar ist. Dabei wurden die Zellbestandteile durch das in der Substitutionslösung enthaltene Glutardialdehyd chemisch fixiert und ihr Kontrast mittels Uranylacetat erhöht. Die frisch hergestellte Substitutionslösung wurde in eine Reagenzienwanne mit

Durchflussring-Einsatz gefüllt und in der Gefriersubstitutionsanlage EM AFS2 auf -140°C vorgekühlt. Die bis zu diesem Zeitpunkt in flüssigem Stickstoff gelagerten, hochdruckgefrorenen Proben wurden mit der Probenseite nach oben in die Vertiefungen eingelegt. Das automatische Programm erhöhte die Temperatur schrittweise auf 0°C , wodurch die Proben allmählich durch die Substitutionslösung dehydratisiert wurden. Das verwendete Programm setzte sich wie folgt zusammen:

Schritt	Starttemperatur	Endtemperatur	Anstieg	Zeit
1	-140°C	-90°C	5°C/h	10 h
2	-90°C	-90°C	0°C/h	8 h
3	-90°C	-60°C	5°C/h	6 h
4	-60°C	-60°C	0°C/h	8 h
5	-60°C	-30°C	$7,5^{\circ}\text{C/h}$	4 h
6	-30°C	-30°C	0°C/h	3 h
7	-30°C	0°C	$7,5^{\circ}\text{C/h}$	4 h
8	0°C	0°C	0°C/h	2 h

7.2.3 Infiltration und Einbettung

Einbettungsmittel Epon[®] 812

Epoxy-Einbettungsmittel	46 % (v/v)
DDSA	28,5 % (v/v)
MNA	25,3 % (w/v)
DMP-30	0,2 % (w/v)

Die ersten drei Komponenten wurden 30 min unter leichtem Rühren gemischt. Anschließend wurde DMP-30 zugegeben und die Lösung weitere 30 min gerührt.

Nach Ende der Gefriersubstitution wurde die Reagenzienwanne mitsamt Proben aus der Gefriersubstitutionsanlage entnommen und auf Eis gelagert. Die Substitutionslösung wurde abgesaugt, die Proben dreimal mit eiskaltem Aceton gewaschen und anschließend mit einem Epon-Aceton-Gemisch im Verhältnis 1:1 versetzt. Nach zweistündiger Inkubation auf Eis wurde die Lösung gegen ein Epon-Aceton-Gemisch im Verhältnis 2:1 ausgetauscht und die Proben über Nacht bei Raumtemperatur im Abzug gelagert. Durch das Verdampfen des Acetons erhöhte sich die Epon-Konzentration kontinuierlich. Am nächsten Tag wurde das alte Epon durch ein frisch zubereitetes Einbettungsmittel ersetzt. Im Zuge dieses Schrittes wurden die Proben mit einem Datenzettel etikettiert. Die Aushärtung des Harzes erfolgte zunächst für zwei Stunden bei 30°C im Wärmeschrank. Nach Ablauf dieser Zeitspanne wurde die Temperatur auf 60°C erhöht und die Proben für zwei Tage unter diesen Bedingungen inkubiert.

7.2.4 Vorbereitung der eingebetteten Proben

Nach der Auspolymerisierung des Epons wurden die eingebetteten Proben mithilfe einer Rasierklinge aus der Reagenzienwanne geschnitten und das den Goldträger umgebende Epon weitestgehend entfernt. Durch Kühlen des Goldträgers in flüssigem Stickstoff und darauffolgender Erwärmung auf einer Heizplatte löste sich dieser ab und legte die Probe frei. Der Eponblock wurde in eine spezielle Halterung eingespannt, die sowohl am Trimmgerät als auch am Ultramikrotom fixiert werden konnte. Das Trimmen erfolgte unter Verwendung der Fräse Leica EM Trim2, wobei das Fräsen von allen vier Seiten in einem Winkel zwischen 30° und 45° eine rechteckige Grundfläche ergab.

7.2.5 Ultramikrotomie

Ultradünnschnitte wurden mit den Ultramikrotomen Ultracut E bzw. Leica EM UC7 in Verbindung mit einem Diamantmesser vom Typ Histo durchgeführt. Die Probe wurde eingespannt und der Wasserstand des Messers so eingestellt, dass sich eine ebene, silbrig-matte Oberfläche bildete. Die Schnitte erfolgten bei einem Vorschub von 50 nm und einer Schnittgeschwindigkeit von 0,8 mm/s. Der Schneidevorgang wurde im Binokular verfolgt und die Schnittdicke anhand der Farbe des Schnittes abgeschätzt, wobei eine silbriggraue Farbe auf 50 bis 70 nm dicke Schnitte hindeutete. Die Ultradünnschnitte konnten mithilfe eines präparierten Kupfer-Slot-Grids von der Wasseroberfläche „gefischt“ und auf unbefilmte Nickel-Grids (200 mesh) übertragen werden. Der sich zwischen den Grids befindende Wassertropfen wurde mit einem Filterpapier seitlich abgezogen und die Grids vorsichtig voneinander gelöst. Sollten die Schnitte immunmarkiert werden, so wurde darauf geachtet, dass Schneidevorgang und Immunmarkierung an einem Tag erfolgten, um eine bestmögliche Markierung zu erzielen.

7.3 Immunmarkierung für die Elektronenmikroskopie

Immunmarkierungen wurden an Suspensionspräparaten, bewachsenen Gold-Grids und Ultradünnschnitten durchgeführt. Die Vorgehensweisen unterschieden sich in Bezug auf die verwendeten Puffer und die Dauer der einzelnen Inkubationsschritte, weswegen sie im Folgenden getrennt aufgeführt werden.

Allen Immunmarkierungen gemeinsam war jedoch die technische Vorgehensweise: Sämtliche Lösungen wurden tropfenweise (ca. 25 µl) auf Parafilm vorgelegt und die Präparate mit der Probenseite nach unten darin inkubiert. Vor Überführung auf den nächsten Tropfen wurde die überschüssige Flüssigkeit auf einem Filterpapier abgezogen. Die Antikörperverdünnungen wurden vor Gebrauch frisch hergestellt und zur Entfernung von Präzipitaten zentrifugiert (3 min, 13.800 x g, Biofuge 13). Es wurde stets eine Negativkontrolle ohne primären Antikörper mitgeführt.

Die Detektion der antigenspezifischen Primärantikörper erfolgte über speziesspezifische Sekundärantikörper, an die Goldpartikel gekoppelt waren. Aufgrund ihrer Elektronenundurchlässigkeit waren diese später im TEM als schwarze Punkte auf hellem Hintergrund sichtbar.

7.3.1 Immunmarkierung an Suspensionspräparaten und bewachsenen Gold-Grids

PBG-Puffer

NaCl	137 mM
KCl	2,7 mM
Na ₂ HPO ₄	10 mM
KH ₂ PO ₄	1,76 mM
Gelatine	0,2 % (w/v)
BSA	0,5 % (w/v)

Der pH wurde mit 1 M HCl auf 7,4 eingestellt. Der PBG-Puffer wurde stets frisch hergestellt, wobei die einzelnen Bestandteile durch Erhitzen gelöst wurden. Nach Abkühlung und Einstellung des pH-Wertes wurde die Lösung über einen 0,22 µm Sterilfilter gepresst. PBG-Glutardialdehyd wurde kurz vor der Verwendung hergestellt.

Suspensionspräparate wurden wie unter II.7.1 beschrieben hergestellt, jedoch nicht kontrastiert. Bewachsene kohlebeschichtete Gold-Grids wurden aus den Serumflaschen entnommen und zum Ablösen von Präzipitaten und nicht fest anhaftenden Zellen kurz in aerobem MS-Waschpuffer (siehe II.2.1.1) geschwenkt. In beiden Fällen konnten die Grids im Vorfeld der Immunmarkierung einer Hitzedenaturierung unterzogen werden. Die 20-minütige Inkubation bei 120°C sollte zusätzliche Epitope für den primären Antikörper freilegen und somit ein besseres Ergebnis liefern. Die darauffolgenden Arbeitsschritte sind tabellarisch aufgeführt:

Schritt	Substanz	Dauer
Blockieren	PBG	5 min
Markierung mit 1° Antikörper	AK verdünnt in PBG	25 min
Waschen	PBG	3 x 2 min
Markierung mit 2° Antikörper	AK verdünnt in PBG	45 min
Waschen	PBG	3 x 2 min
Vernetzung von Epitop, 1° und 2° AK	PBG-Glutardialdehyd (2 %, v/v)	2 min
Waschen	PBG	2 x 2 min
Waschen	H ₂ O _{millipore}	2 x 1 min

Der Primärantikörper wurde in der Regel in einer Verdünnung von 1:100, der Sekundärantikörper 1:50 eingesetzt. Bei Letzterem handelte es sich um einen Antikörper, an den Goldkörner mit einem Durchmesser von 6 nm gekoppelt waren. Nach der Immunmarkierung wurden die Präparate wie unter II.7.1 beschrieben mit Uranylacetat kontrastiert und anschließend luftgetrocknet.

7.3.2 Immunmarkierung an Ultradünnschnitten

PBS-Puffer, pH 7,4

NaCl	137 mM
KCl	2,7 mM
Na ₂ HPO ₄	10 mM
KH ₂ PO ₄	1,76 mM
Gelatine	0,2 % (w/v)
BSA	0,5 % (w/v)

Der pH wurde mit 1 M HCl auf 7,4 eingestellt. Der Puffer wurde möglichst frisch hergestellt und autoklaviert. Die drei benötigten PBS-haltigen Lösungen PBS-Glycin, PBS-BSA und PBS-Glutardialdehyd wurden kurz vor Beginn der Immunmarkierung erstellt und über einen 0,22 µm Sterilfilter gepresst.

Die Markierung von Ultradünnschnitten (siehe II.7.2) sollte die Lokalisation bestimmter Proteine innerhalb der Zelle aufzeigen. In folgender Übersicht ist das Vorgehen bei der Immunmarkierung zusammengefasst:

Schritt	Substanz	Dauer
Absättigung von Aldehyden	PBS-Glycin (0,1 %, w/v)	5 min
Blockieren	PBS-BSA (1 %, w/v)	5 min
Markierung mit 1° Antikörper	AK verdünnt in PBS-BSA (0,1 %, w/v)	60 min
Waschen	PBS-BSA (0,1 %, w/v)	5 x 2 min
Markierung mit 2° Antikörper	AK verdünnt in PBS-BSA (0,1 %, w/v)	60 min
Waschen	PBS-BSA (0,1 %, w/v)	5 x 2 min
Waschen	PBS	2 x 2 min
Vernetzung von Epitop, 1° und 2° AK	PBS-Glutardialdehyd (2 %, v/v)	5 min
Waschen	PBS	2 x 2 min
Waschen	H ₂ O _{millipore}	3 x 2 min

Der primäre Antikörper wurde in der Regel in Verdünnungen zwischen 1:25 und 1:100, der sekundäre im Verhältnis 1:25 bzw. 1:50 eingesetzt. Als Sekundärantikörper dienten goat-anti-rabbit-IgGs, an die entweder 6 nm Gold oder ultra-small Gold gekoppelt waren.

Handelte es sich um Antikörper mit 6 nm Gold, so konnten die Grids unmittelbar nach den Waschschritten positiv kontrastiert werden. Dazu wurden sie ca. 20 min in einem Tropfen essigsaurer, 2 %iger (w/v) Uranylacetat-Lösung (siehe II.7.1) inkubiert, bevor sie 4 x 2 min in H₂O_{millipore} gewaschen und anschließend luftgetrocknet wurden. Diese Kontrastierung war allerdings nicht nötig und wurde nur gelegentlich durchgeführt.

Nach Verwendung von Antikörpern, an die ultra-small Gold gekoppelt war, erfolgte eine Silberverstärkung (Danscher *et al.*, 1981) der 0,8 nm großen Goldpartikel, um eine eindeutige Detektion im TEM zu ermöglichen. Die für die Silberverstärkung benötigten Reagenzien wurden freundlicherweise von der AG Prof. Rachel zur Verfügung gestellt. Die genaue Zusammensetzung der benötigten Silberlaktat- bzw. Verstärkerlösung kann der Dissertation von Carolin Meyer (2010) entnommen werden. Je ein Aliquot Silberlaktat- sowie Verstärkerlösung wurden im Dunkeln aufgetaut, miteinander vermischt und unmittelbar vor Gebrauch

3 min bei 13.800 x g (Biofuge 13) abzentrifugiert. Die Grids wurden unter Lichtausschluss 15 min in einem Tropfen dieser Lösung inkubiert und anschließend 6 x 2 min in einem Tropfen $\text{H}_2\text{O}_{\text{millipore}}$ gewaschen. Die Grids konnten zuletzt ebenfalls einer Positivkontrastierung mit Uranylacetat (s.o.) unterzogen werden.

8 Generierung und Aufreinigung polyklonaler Antikörper

In dieser Arbeit wurden Antikörper gegen das putative Chaperon Mth59, sowie gegen die Fimbrien von *M. thermoautotrophicus* generiert.

8.1 Generierung primärer Antikörper gegen Mth59

Zur Herstellung polyklonaler Antikörper wurde das rekombinant erzeugte und aufgereinigte Mth59 (siehe II.5.3) über SDS-Gelelektrophorese (siehe II.5.5) aufgetrennt. Das Gel wurde mit Coomassie gefärbt und anschließend über eine modifizierte Entfärberlösung (12 % Ethanol, 3 % Essigsäure, v/v) schrittweise entfärbt. Die entsprechende Bande wurde mit einem Einmalskalpell ausgeschnitten, in ein 2 ml Reaktionsgefäß überführt und zur Firma Davids Biotechnologie, Regensburg, gebracht. Die von den Mitarbeitern extrahierten Proteine dienten der Immunisierung eines Kaninchens. Im Vorfeld wurden Präimmunseren unterschiedlicher Tiere zur Verfügung gestellt und im Western Blot auf Kreuzreaktionen mit Mth59 hin untersucht. Für die Immunisierung wurde das Tier mit der geringsten Kreuzreaktion ausgewählt. Um ein reaktives Serum zu erhalten, waren mehrere Booster-Immunisierungen von Nöten. Nach jeder Immunisierungsrunde wurde der Titer des erhaltenen Testserums über Western Blot bestimmt.

8.2 Generierung primärer Antikörper gegen die Mth60-Fimbrien

Ein Teil der isolierten und aufgereinigten *M. thermoautotrophicus*-Fimbrien (siehe II.5.1) wurde zur Immunisierung eines Kaninchens sowie eines Huhns verwendet. Zur Auswahl der zu immunisierenden Tiere wurden Präimmunseren auf eine Kreuzreaktion mit den Fimbrien im Western Blot untersucht. Anschließend wurden etwa 200 µg Fimbrien zu Davids Biotechnologie, Regensburg, gebracht. Titerbestimmungen fanden nach jeder Booster-Immunisierung statt.

8.3 Aufreinigung polyklonaler Kaninchen IgG-Antikörper

Natriumphosphat-Puffer, pH 7,0		Elutionspuffer, pH 2,7	
Na_2HPO_4	20 mM	Glycin/HCl	100 mM
NaH_2PO_4	20 mM	Der pH wurde auf 2,7 eingestellt.	

Es wurden zwei Stammlösungen gemacht und gegeneinander auf pH 7,0 titriert.

Nach der erfolgreichen Immunisierung eines Kaninchens wurden etwa 50 ml Serum erhalten, aus denen die Immunglobuline des Typs G (IgG) über Affinitätschromatographie spezifisch

aufgereinigt werden mussten. Zu diesem Zweck wurden *HiTrap[®] Protein G HP* Säulen verwendet. Dabei handelt es sich um mit Sepharose gefüllte Säulen, bei denen das Protein G, ein Oberflächenprotein aus *Streptococcus*, fest an die N-Hydroxysuccinimid (NHS)-aktivierte Gelmatrix gebunden ist. Das Protein G dient bei diesem Aufreinigungsprinzip als Ligand, an dem die IgGs mit ihrem Fc-Teil binden.

Die Aufreinigung erfolgte an der ÄKTA bei 4°C mit einer Durchflussrate von 1 ml/min. Zur Entfernung von Präzipitaten wurden alle verwendeten Lösungen im Vorfeld filtriert. Dies geschah über eine Wasserstrahlpumpe und einem Filter mit einer Porengröße von 0,45 µm. Die Säule wurde zunächst mit zehn Säulenvolumen Bindepuffer gewaschen und mit 20 ml des Antiserums beladen, das zuvor durch einen 0,45 µm Spritzenfilter gepresst worden war. Im Anschluss wurde die Säule so lange mit Bindepuffer gespült, bis im Durchlauf kein Material mehr über den UV₂₈₀-Wert nachgewiesen werden konnte. Die Elution der Antikörper erfolgte mit fünf Säulenvolumen Elutionspuffer, wobei die Eluate in 1,2 ml Fraktionen aufgefangen wurden. Zur sofortigen Neutralisation der Fraktionen wurden in den Auffangbehältern jeweils 40 µl 1 M Tris/HCl, pH 9,0 vorgelegt. Die Fraktionen, die laut UV₂₈₀-Wert Antikörper enthielten, wurden vereinigt und der pH-Wert mittels pH-Papier abgeschätzt. Dieser sollte in einem neutralen Bereich liegen und konnte gegebenenfalls korrigiert werden. Die Antikörper-Fraktionen wurden bei 8°C gegen PBS-Puffer (pH 7,4, siehe II.7.3.2) dialysiert (siehe II.5.1.6). Anschließend wurde die Konzentration bestimmt (siehe II.5.4). Nach Zugabe von 50 % (v/v) Glycerin wurden die Antikörper zu 50 bzw. 20 µl aliquotiert und bei -20° bzw. -80°C gelagert. Der Erfolg der Reinigung wurde über SDS-PAGE analysiert (siehe II.5.5).

8.4 Aufreinigung polyklonaler Huhn IgY-Antikörper

Die im Huhn erzeugten, polyklonalen Antikörper sollten aus dem Eidotter isoliert werden. Dazu lieferte die Firma Davids Biotechnologie, Regensburg, 50 ml einer Eidotter-Lösung, die bereits einer Salz- und Lipidpräzipitation unterzogen worden war. Da die im Eigelb enthaltenen Immunglobuline vom Typ Y (IgY) sind und keine Wechselwirkung mit dem Protein G eingehen, erfolgte die Aufreinigung über einen speziellen Kit, dem *Chicken IgY Purification Kit*. Dabei wurde die erhaltene Lösung zur Entfernung von Präzipitaten 15 min bei 8.000 x g und 4°C (Centrifuge 5402) abzentrifugiert. Der klare Überstand wurde 1:1 mit kalter Präzipitationslösung (im Kit enthalten) versetzt, 2 min sanft gemischt und über Nacht bei 4°C gelagert. Die Suspension wurde kurz gemischt und anschließend erneut 15 min bei 8.000 x g (4°C, Centrifuge 5402) zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die im Pellet enthaltenen, gefällten Antikörper in PBS (pH 7,4, siehe II.7.3.2) resuspendiert. Die Konzentration wurde bestimmt (siehe II.5.4) und die Antikörper nach Zugabe von 50 % (v/v) Glycerin aliquotiert und bei -20° bzw. -80°C gelagert. Zur Überprüfung der Reinheit der erhaltenen Antikörper wurden diese über SDS-PAGE analysiert (siehe II.5.5).

III Ergebnisse

1 Bestimmung der Transkriptmengen der *mth60*-Gencluster

Wie bereits in der Einleitung erwähnt, wird das für das Hauptfimbrien Mth60 kodierende Gen mit benachbarten Genen co-transkribiert. Dabei umfasst ein Operon die Gene *mth60*, *mth59* und *mth58*. Eine weitere Transkriptionseinheit bildet *mth60* mit *mth61*. Diese Ergebnisse wurden mittels Reverser-Transkriptions-PCR (RT-PCR) und Northern Blots erhalten. Die Auswertung der semi-quantitativen Northern Blots zeigte zudem, dass die Menge an *mth60*-mRNA um ein Vielfaches erhöht ist als die der Co-Transkripte *mth60/mth59/mth58* und *mth61/mth60* (Sarbu, 2009). Um eine genaue Aussage über die einzelnen Transkriptmengen machen zu können, wurden quantitative RT-PCRs (qRT-PCRs) durchgeführt.

1.1 RNA-Isolierung und reverse Transkription

Der Zellaufschluss der bis zur stationären Phase gewachsenen *M. thermoautotrophicus*-Zellen erfolgte mechanisch über Glaskügelchen im FastPrep-Homogenisator unter Anwendung von 20 Zyklen zu je 40 s. Diese Art des Zellaufschlusses hatte sich als optimal für eine anschließende RNA-Isolierung mittels Trizol herausgestellt (Sarbu, 2009). Nach Verdau der enthaltenen DNA wurde die RNA über Phenol-Chloroform-Fällung aufgereinigt und ihre Qualität über Gelelektrophorese geprüft (Abb. III.1). Dabei zeigte sich eine intakte Gesamt-RNA mit den beiden prominenten Banden bei etwa 3.000 und 1.500 Basen, bei denen es sich um die 23S und 16S rRNA handelte. Die schwache Bande im niedermolekularen Bereich stellte vermutlich kleine RNAs, wie tRNAs und die 5S rRNA, dar.

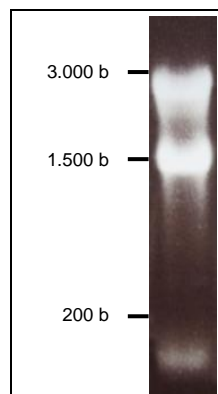


Abb. III.1: Überprüfung der isolierten Gesamt-RNA von *M. thermoautotrophicus* DeltaH. Agarose-Gelelektrophorese (1,2 %). Die beiden dominanten Banden stellen die 23S und 16S rRNA dar und lassen darauf schließen, dass die RNA weder durch mechanische Kräfte noch durch RNasen stark geschädigt wurde.

Die RNA wurde über reverse Transkription mittels Random Hexamer Primer, die das Umschreiben aller Sequenzen in gleichem Maße sicherstellen, in cDNA umgeschrieben und anschließend mit RNase verdaut. Dabei wurde ein entsprechend großer Ansatz gewählt, der gewährleistete, dass die erhaltene cDNA als Template für alle qRT-PCRs ausreichte. Nach Fällung der cDNA wurde ihre Konzentration am NanoDrop über die entsprechende Einstellung bestimmt. Zwar handelt es sich dabei um keine Messmethode mit außerordentlich hoher Genauigkeit, jedoch konnte davon ausgegangen werden, dass alle qRT-PCR-

Ansätze aufgrund der beschriebenen Vorgehensweise den gleichen Fehler aufwiesen. Parallel wurde ein Ansatz ohne reverse Transkriptase mitgeführt. Dieser diente in den qRT-PCRs als Kontrolle zur Bestimmung der Signale, die von Verunreinigungen der RNA und damit auch der cDNA mit genomischer DNA herrührten.

1.2 Bestimmung der Effizienz der Primerpaare

Vor dem Einsetzen eines jeden Primerpaares in die qRT-PCR musste zunächst die Amplifikationseffizienz bestimmt werden. Im optimalen Fall beträgt diese in der exponentiellen Phase der PCR 100 %, das heißt, dass sich die Menge des PCR-Produktes in jedem Zyklus verdoppelt. Diese Effizienz kann abhängig von den gewählten Primern bzw. dem GC-Gehalt der zu amplifizierenden Sequenz variieren und sollte für eine aussagekräftige Quantifizierung zwischen 80 und 110 % betragen (www.sigmaaldrich.com; qPCR Technical Guide). Als Template für diese Vorversuche diente das Plasmid pET-14b, das *mth61-mth58* als Insert enthielt (siehe III.3.1) und demnach identische Ergebnisse wie die cDNA lieferte. Um die Effizienzen zu bestimmen wurde das Plasmid mehrmals um den Faktor 10 verdünnt und jede der entstandenen DNA-Konzentrationen (15 pg/µl bis 0,015 pg/µl) als Triplett-Ansatz in die qPCR eingesetzt. Die Rotor-Gene 6000 Software erstellte aus den eingesetzten Template-Mengen und den zugehörigen C_T-Werten eine Standardkurve und ermittelte daraus die Amplifikationseffizienzen. Dabei ergaben sich für alle getesteten Primerpaare sehr gute Effizienzen mit Werten zwischen 89 und 106 %. Ferner wurden auch die Schmelzkurven der amplifizierten PCR-Produkte ausgewertet. In allen Fällen handelte es sich um ein spezifisches Amplifikat, das durch einen charakteristischen Peak bei der jeweiligen Schmelztemperatur dargestellt wurde. Damit konnten unspezifische PCR-Produkte sowie Primer-Dimere, die über SYBR Green I ebenfalls detektiert werden, ausgeschlossen werden. Die Rohdaten dieser Testreihen sind auf der Begleit-CD zu finden (siehe VI.5).

1.3 Untersuchung der Transkriptmengen

Zur Bestimmung der (Co-)Transkriptmengen der Gene *mth61* bis *mth58* wurden sowohl die mRNAs (bzw. cDNAs) der einzelnen Gene als auch die der intergenen Regionen quantifiziert, wobei die Primer so gewählt wurden, dass sie stets im Bereich der kodierenden Sequenzen banden. Es wurde darauf geachtet, dass die Länge der gebildeten Amplifikate möglichst etwa 150 bp betrug, weil dies dem optimalen Wert für eine quantitative PCR entspricht. Eine Ausnahme bildete hier das Primerpaar für *mth61-mth60* aufgrund einer intergenen Region von 177 Basen. Abb. III.2 zeigt schematisch die Lokalisation der verwendeten Primerpaare. Dabei beziehen sich die dargestellten Gene sowie die Längen der intergenen Regionen auf Daten, die durch Nachsequenzierung dieser Genomregion erhalten wurden und von den in der Datenbank NCBI hinterlegten Sequenzen abweichen (Sarbu, 2009).

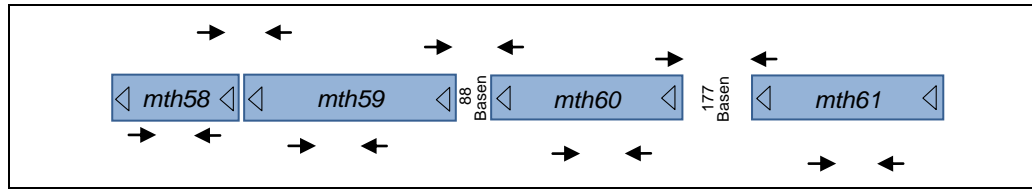


Abb. III.2: Schematische Darstellung der in die qRT-PCR eingesetzten Primerpaare. Zwischen den kodierenden Sequenzen ist die Länge der intergenen Regionen gekennzeichnet. Der Abstand zwischen *mth59* und *mth58* beträgt 6 Basen. ◁ markiert die Transkriptionsrichtung der kodierenden Bereiche; die Pfeile zeigen die Lage der Vorwärts- → und der Rückwärtsprimer ← an.

Die Ermittlung der einzelnen Transkriptmengen erfolgte aus der cDNA über absolute Quantifizierung. Dabei wurde – wie bereits zum Testen der Primereffizienzen – das Plasmid pET-14b mit *mth61-mth58* als Insert zur Erstellung der Standardkurve eingesetzt. Für jeden PCR-Lauf und jedes Primerpaar wurden sowohl vom Plasmid als auch von der cDNA vier unterschiedliche zehnfach Verdünnungen als Triplettsansätze pipettiert, wodurch experimentelle Fehler auf ein Minimum reduziert werden konnten. Als Kontrolle diente neben der Negativkontrolle aus der reversen Transkription auch eine *no template control* mit H₂O.

Zur Planung und Auswertung dieser Versuche wurden die Veröffentlichungen von Lu *et al.* (2012) sowie Whelan *et al.* (2003) herangezogen. In beiden Fällen wurden cDNA-Mengen über absolute Quantifizierung unter Zuhilfenahme eines entsprechenden Plasmids bestimmt und schlussendlich als Transkriptkopien pro ng cDNA angegeben.

Aus Gründen der Übersichtlichkeit finden sich die durchgeführten Berechnungen sowie die tabellarisch aufgeführten qRT-PCR-Daten im Anhang (siehe VI.3 und VI.5). Um ein signifikantes Ergebnis zu erzielen, wurden für jedes Primerpaar drei Quantifizierungen durchgeführt, die Ergebnisse gemittelt und die Standardabweichung berechnet. Das Resultat dieser Experimente ist in Abb. III.3 dargestellt und zeigt eindeutig große Unterschiede in den Mengen der Transkripte. Wie bereits aus den Northern Blots hervorging, ist die cDNA- und damit die mRNA-Menge des Gens *mth60* deutlich erhöht verglichen mit den restlichen (Co-)Transkripten. Dieses Ergebnis bestätigt die Funktion des Proteins Mth60 als Hauptbestandteil der Fimbrien von *M. thermoautotrophicus*. Verglichen mit der Anzahl der Transkriptkopien der Gene *mth61*, *mth59* und *mth58* ist die *mth60*-mRNA um den Faktor 5,8, 7,3 bzw. 3,3 erhöht. Auffällig ist zudem, dass die Transkriptmengen, die auf polycistronische mRNAs zurückzuführen sind (in der Abbildung hellgrau dargestellt) von den Transkriptmengen der einzelnen co-transkribierten Gene (dunkelgrau) abweichen. Vor allem im Falle des Operons *mth60/mth59/mth58* ist die cDNA- bzw. mRNA-Menge nicht über ihre gesamte Länge hindurch konstant hoch. Dass es sich dabei dennoch, selbst im Fall des Primerpaares zur Quantifizierung der *mth60/mth59*-mRNA, eindeutig um eine Co-Transkription dieser Gene handelt, zeigten qRT-PCR-Ansätze, in denen die Negativkontrolle aus der reversen Transkription eingesetzt wurde. Demnach ist das Signal, das von Verunreinigungen mit genomischer DNA herrührt – sofern überhaupt bestimmbar – für alle Experimente vernachlässigbar gering (siehe VI.3 und VI.5).

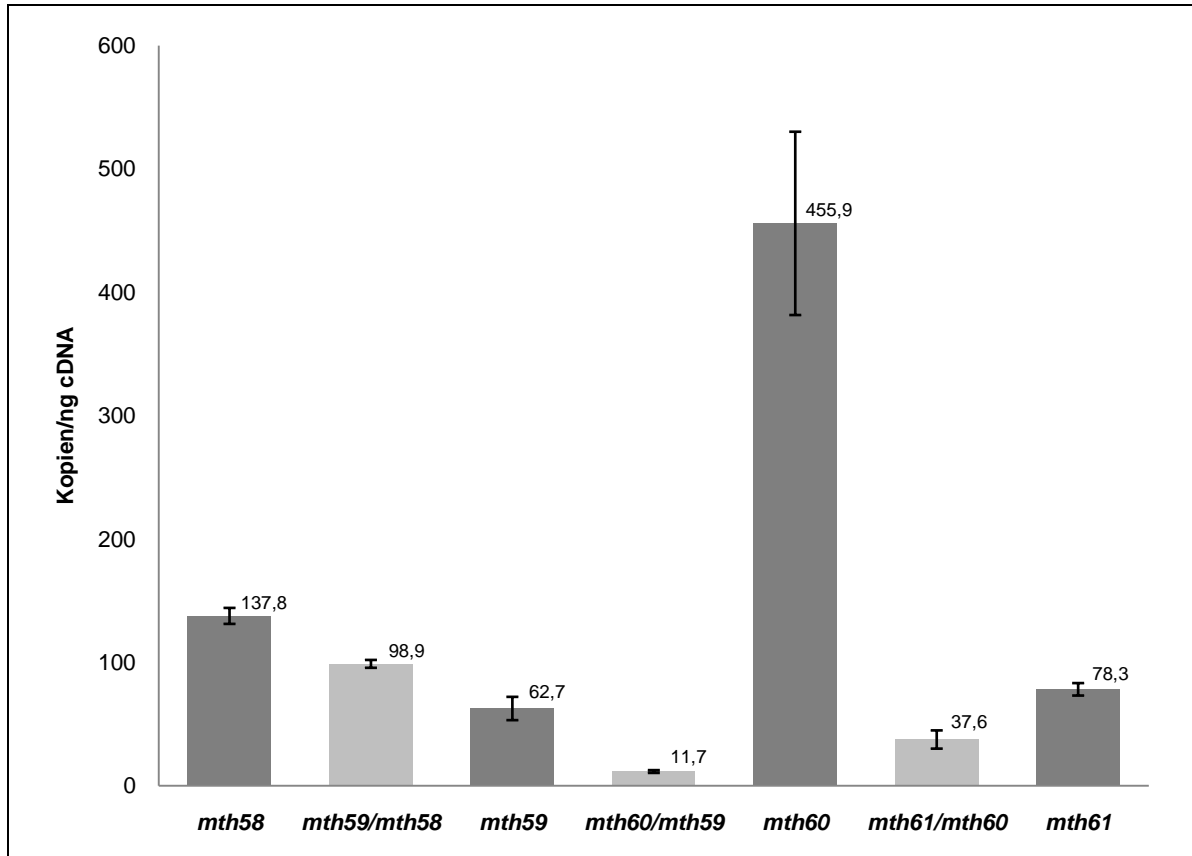


Abb. III.3: Darstellung der über qRT-PCR ermittelten Transkriptmengen der einzelnen Gene *mth58*, *mth59*, *mth60* und *mth61* sowie der intergenen Regionen in Kopien/ng cDNA. Die Transkriptmengen der einzelnen Gene sind in dunkelgrau dargestellt, die der bicistronischen mRNAs in hellgrau.

2 Bioinformatische Analysen

Über die Zusammensetzung der Fimbrien von *M. thermoautotrophicus* ist bislang lediglich bekannt, dass sie aus dem glykosylierten Hauptfimbrien Mth60 bestehen. Aufgrund der Co-Transkription von *mth60* mit den benachbarten Genen *mth61*, *mth59* und *mth58* ist davon auszugehen, dass die zugehörigen Genprodukte ebenfalls am Aufbau der Fimbrien beteiligt sind. Wie bereits in Kap. I beschrieben, konnten aufgrund fehlender Homologien zu Proteinen mit bekannten Funktionen keinerlei Aussagen bezüglich Mth58 und Mth61 getroffen werden. Anders sah es für Mth59 aus, welches signifikante Ähnlichkeiten zu Chaperonen, wie z.B. dem Protein Caf1M aus *Yersinia pestis*, aufwies (Sarbu, 2009).

Um potentielle Homologien zu kürzlich veröffentlichten Genomen zu studieren, wurden erneut Vergleiche der Nukleotid- und Aminosäuresequenzen (vgl. VI.2) über die Blast-Suche der Datenbank NCBI durchgeführt. Zusätzlich wurde das deutlich empfindlichere Programm HHpred verwendet. Jedoch lieferten diese Analysen keine neuen und signifikanten Ähnlichkeiten zu Proteinen mit bekannten Funktionen.

Für die Vorhersage charakteristischer Eigenschaften der Proteine Mth58, Mth59 und Mth61 wurden die Aminosäuresequenzen über eine Reihe öffentlich zugänglicher Suchalgorithmen analysiert. Die erhaltenen Daten sind in Tab. III.1 vergleichend dargestellt.

Demnach wurde Mth58 als cytoplasmatisches Protein eingestuft. Dies steht im Einklang mit weiteren Analysen, die das Fehlen von Signalpeptid und Glykosylierungen vorhersagten. Im Gegensatz zum Programm PSORTb ermittelten Phobius und TMHMM eine Transmembrandomäne im C-terminalen Bereich des Proteins und deuteten auf ein Membranprotein hin, dessen N-Terminus außerhalb der Cytoplasmamembran lokalisiert ist.

Für das Protein Mth59 wurden ein Signalpeptid sowie eine posttranslationale Modifizierung in Form einer N-Glykosylierung mit zwei Zuckerketten bescheinigt. Bei der von TMHMM genannten Transmembranhelix handelt es sich entsprechend Phobius um ein Signalpeptid, welches laut Krogh *et al.* (2001) aufgrund seiner hydrophoben Region oft fälschlicherweise als Transmembrandomäne ausgegeben wird. Auch wenn PSORTb die zelluläre Lokalisation von Mth59 nicht vorherzusagen vermochte, so deuten die Resultate der Programme Phobius und TMHMM, mit Ausnahme des Signalpeptids, eine Lokalisation außerhalb der Cytoplasmamembran an. In Anbetracht einer potentiellen Funktion als Faltungshelfer bei der Fimbrienassemblierung wäre eine Positionierung im Bereich zwischen Membran und Pseudomureinschicht denkbar. Auf ein sich (zumindest teilweise) außerhalb der Cytoplasmamembran befindendes Protein lässt auch die Glykosylierung schließen.

Mth61 wurde übereinstimmend als extrazelluläres, glykosyliertes Protein klassifiziert, dessen N-Terminus ein Signalpeptid darstellt. Demnach wäre es möglich, dass es sich dabei um ein Strukturprotein der Fimbrien handelt, das nur in geringen Mengen in diesen enthalten ist.

Protein	molekulare Masse [ProtParam]	N-/O-Glykosylierungsstellen [NetNGlyc/NetOGlyc]	Signalpeptid [Phobius, PRED-SIGNAL]	Transmembranhelix [Phobius/TMHMM]	zelluläre Lokalisation [PSORTb]
Mth58	11,7 kDa	- / -	nein	1 / 1	C
Mth59	20,7 kDa	2 / -	ja	0 / 1	CM/ZW/EZ*
Mth61	18,5 kDa	3 / -	ja	0 / 1	EC

Tab. III.1: Bioinformatische Analyse der Proteine Mth58, Mth59 und Mth61 anhand verschiedener Vorhersageprogramme. Die Programme sind in eckigen Klammern angegeben. C: Cytoplasma; CM: Cytoplasmamembran; ZW: Zellwand; EZ: extrazellulär; * die drei Lokalisationen wurden als gleich wahrscheinlich eingestuft.

Da die Faltungsweise eines Proteins in der Evolution stärker konserviert ist als die Aminosäuresequenz, wurden die Proteine auf der Suche nach Homologien mit dem Programm Phyre abgeglichen. Der Algorithmus basiert auf dem Prinzip der Homologie-modellierung und erstellt eine akkurate Vorhersage dreidimensionaler Strukturen auch für weit entfernte Homologien zwischen Proteinen mit einer Aminosäuresequenzidentität von unter 15 %.

Die Strukturvorhersage war für die Proteine Mth58, Mth60 und Mth61 aufgrund fehlender signifikanter Homologien zu den in der Datenbank enthaltenen 65.000 Faltungsformen nicht möglich, so dass es sich dabei um strukturell neuartige Proteine handeln könnte.

Im Gegensatz dazu konnte für Mth59 eine Proteinraumstruktur modelliert werden. Diese ist in Abb. III.4 A dargestellt und zeigt eine N-terminale Helix (blau) sowie zahlreiche β -Faltblätter im Mittelteil des Proteins. Die Struktur konnte aufgrund signifikanter Homologien zu anderen Proteinen erstellt werden, wobei 98 % der Aminosäuren mit einer über 90 %igen Sicherheit modelliert wurden. Die als homolog bezeichneten Strukturen sind beinahe ausschließlich am Aufbau von Zellanhängen beteiligte Chaperone. Unter den ersten zehn Treffern finden sich die periplasmatischen Chaperone SafB (*Salmonella typhimurium*), Caf1M (*Yersinia pestis*), FimC und SfaE (beides *E. coli*). All diese Proteine werden zur Familie der PapD-ähnlichen Chaperone gezählt und weisen zwei Immunglobulin-ähnliche Domänen mit zahlreichen β -Faltblättern auf, die L-förmig zueinander ausgerichtet sind. Auch das von Phyre als homologes Protein gennante periplasmatische Chaperon CupB2 (*Pseudomonas aeruginosa*) wird laut neueren Untersuchungen als PapD-ähnliches Protein eingestuft (Cai *et al.*, 2011). Als weitere homologe Strukturen wurden auch ein Protein mit unbekannter Funktion (*Porphyromonas gingivalis*) und die Linker-Domäne einer Sialidase (*Micromonospora viridifaciens*) aufgeführt. Die Aminosäuresequenzidentitäten zwischen allen genannten Proteinen und Mth59 liegen bei lediglich 11 bis 21 %. Dennoch betragen die Wahrscheinlichkeiten, dass es sich um echte Homologien handelt zwischen 98,4 und 99 %. Die vollständigen Daten dieser Homologiemodellierung finden sich auf der Begleit-CD (siehe VI.5).

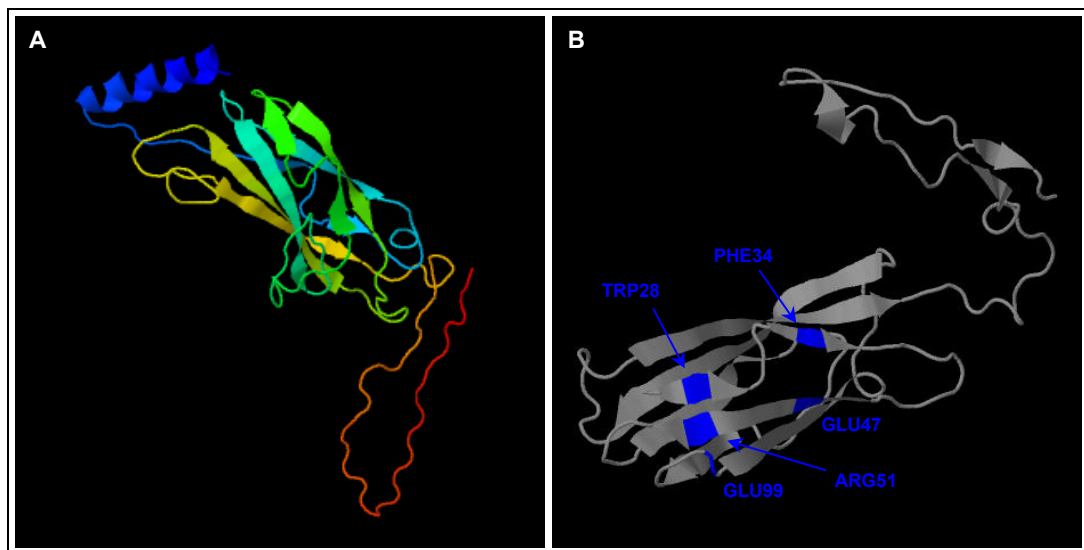


Abb. III.4: Dreidimensionale Darstellungen des putativen Chaperons Mth59. A: Strukturvorhersage aufgrund von Homologiemodellierung durch den Algorithmus Phyre. Die N-terminale α -Helix ist in blau dargestellt, der C-Terminus in rot. B: Vorhersage der Aminosäuren, die an der Bindung von Liganden beteiligt sind, durch das Programm 3DLigandSite. Der C-Terminus des Proteins befindet sich in der rechten oberen Ecke, die N-terminale Helix ist nicht dargestellt.

Nach Ermittlung der dreidimensionalen Struktur von Mth59 konnte diese herangezogen werden, um die Bindungsregion von Liganden vorauszusagen. Dies geschah unter Verwendung des Programms 3DLigandSite durch Vergleich mit homologen Proteinstrukturen, deren Röntgenstruktur im Komplex mit einem Liganden aufgeklärt worden war. Die Bindungsstellen des Proteins Mth59 wurden anhand von 32 Liganden ermittelt und sind in Abb. III.4 B

dargestellt. In dieser Darstellung findet sich der C-Terminus im rechten oberen Bereich des Bildes, die N-terminale Helix ist nicht dargestellt. Es zeigte sich, dass die voraussichtlich an Interaktionen beteiligten Positionen (Trp28, Phe34, Glu47, Arg51, Glu99) des 190 Aminosäuren langen Proteins in dem dem N-Terminus zugewandten Bereich des Proteinmittelteils liegen.

3 Klonierung und Expression

Zur Charakterisierung der Proteine, deren Gene mit *mth60* co-transkribiert werden, sollten Mth58, Mth59 und Mth61 rekombinant in *E. coli* hergestellt und gegebenenfalls Antikörper generiert werden. Ferner sollte vor allem auch das Hauptfimbrin rekombinant erzeugt werden, da der Versuch hierzu in der Vergangenheit größtenteils erfolglos geblieben war.

3.1 Klonierung und Expression der Gensequenz *mth61-mth58*

Von besonderem Interesse für diese Arbeit war die Expression von *mth60*, welche zunächst durch Klonierung der gesamten Sequenz *mth61-mth58* bewerkstelligt werden sollte. Grund hierfür waren Ergebnisse aus einer vorangegangenen Arbeit, die zeigten, dass die alleinige Expression von *mth60* toxisch auf *E. coli* wirkt und nur gelingt, wenn das rekombinante Protein mit dem Hitzeschockprotein HspA von *E. coli* assoziiert vorliegt (Frank, 2006). Aufgrund dieses Ergebnisses sollte versucht werden, *mth60* zusammen mit den restlichen Genen zu exprimieren, die aller Wahrscheinlichkeit nach an der Assemblierung der Fimbrien beteiligt sind – darunter vor allem die Gensequenz für das putative Chaperon Mth59. Erste Versuche diesbezüglich sind gemacht worden, indem die Sequenz *mth60-mth58* in den Vektor pUC19 ligiert und in *E. coli* DH5 α transformiert wurde (Sarbu, 2009). Obwohl es sich dabei weder um einen Expressionsvektor noch einen *E. coli*-Expressionsstamm handelte, konnte im Western Blot eine geringe basale Expression von *mth60* detektiert werden.

Um dies weiter zu untersuchen, sollte nun die gesamte Sequenz von *mth61* bis *mth58* kloniert und exprimiert werden. Zur Amplifizierung wurde eine PCR mit dem entsprechenden Primerpaar (siehe II.1.5) bei einer Annealingtemperatur von 55°C durchgeführt. Als Stop-Codon für *mth58* wurde hierbei das über Nachsequenzierung bestimmte Basentriplett gewählt (siehe VI.2). Nach Transformation in *E. coli* DH5 α und Sequenzanalyse des Inserts wurde das Plasmid in verschiedene *E. coli*-Expressionsstämme transformiert: ER2566, Rosetta(DE3)pLysS, BL21 Star(DE3) und BL21(DE3)pLysS. Um die Stabilität der Plasmide in den unterschiedlichen Stämmen zu überprüfen, wurden die Zellen über 10 Generationen hinweg kultiviert. Dabei fiel bei *E. coli* ER2566 bereits frühzeitig eine starke Lyse der Zellen auf. Die aus den anderen drei Stämmen isolierten Plasmide wurden über Restriktionshydrolyse mit *Sa*I linearisiert und elektrophoretisch aufgetrennt. Im Falle von *E. coli* BL21(DE3)pLysS zeigte sich neben der dominanten Bande bei knapp 7.000 bp eine zusätzliche Bande bei etwa 4.700 bp (Daten nicht gezeigt). Diese Größenordnung entspricht

dem leeren Vektor pET-14b. Ähnliche Ergebnisse, die auf einen sehr frühzeitigen Verlust des Inserts und damit auf eine mögliche Toxizität der Fremdgene deuten, wurden auch für Rosetta(DE3)pLysS festgestellt, wenngleich die Menge an leerem Plasmid geringer ausfiel. Allein der *E. coli*-Stamm BL21 Star(DE3) schien das Plasmid mit ligiertem Insert nicht zu verändern, so dass dieser Stamm zur Induktion der Expression aller Fimbrien-spezifischen Gene von *M. thermoautotrophicus* herangezogen wurde.

Allerdings konnte unter keiner der getesteten Induktionsbedingungen (Temperaturen zwischen 18° und 37°C, IPTG-Konzentrationen zwischen 0,4 und 1 mM, Induktionszeiten von 45 min bis 16 h) eine Expression der Fremdgene *mth61-mth58* festgestellt werden. Auf SDS-Gelen konnte weder in der löslichen noch in der unlöslichen cytosolischen Fraktion eine Zunahme der Bandenintensitäten in den erwarteten Größenbereichen erkannt werden. Grund hierfür könnten das lange Insert bzw. die fehlenden Ribosomenbindestellen zwischen den einzelnen Gensequenzen sein. Trotz der geringen, nicht detektierbaren Menge an rekombinanten Proteinen schienen diese toxisch auf *E. coli* zu wirken, da nach längerer Inkubation bei 30° bzw. 37°C eine zunehmende Viskosität des Mediums verzeichnet wurde, die von einer starken Zellyse herrührte. Da außerdem Mth60 – selbst im Falle einer erfolgreichen Expression – aufgrund eines fehlenden Tags nur schwer aufzureinigen gewesen wäre, wurde eine Alternative für die erfolgreiche Expression des Hauptfimbrins gesucht.

3.2 Klonierung und Expression des Genkonstruktes *mth60/mth59*

Der neue Ansatz für die Expression von *mth60* lag in der Erstellung eines künstlichen Genkonstruktes, das sich aus den Sequenzen für Mth60 und dem (vermeintlichen) Chaperon Mth59 zusammensetzte. Mit dem Ziel einer bestmöglichen Expression in *E. coli* wurde die Basenabfolge auf die *codon usage* des Wirtsorganismus angepasst. Zusätzlich wurde an *mth60* eine His-Tag-Sequenz angefügt, die die einfache Aufreinigung des rekombinanten Proteins ermöglichen sollte. Es wurden zwei verschiedene Genkonstrukte von Life Technologies, Regensburg, synthetisiert, die in Folge als Konstrukt I und Konstrukt II bezeichnet werden. Die Nukleotidsequenzen sowie die Diagramme zur Darstellung der optimierten *codon quality* finden sich auf der Begleit-CD (siehe VI.5).

Ein Schema von Konstrukt I ist in Abb. III.5 dargestellt. Dabei handelt es sich um die vollständige *mth60*-Sequenz, deren erste 33 Basenpaare in *M. thermoautotrophicus* für ein N-terminales Signalpeptid kodieren, das im Laufe der Fimbrienassemblierung abgespalten wird. Am C-Terminus von *mth60* befindet sich die Sequenz für einen His-Tag, gefolgt von einem Stop-Codon. Die intergene Region zwischen *mth60* und *mth59* umfasst 39 Basenpaare und enthält die Erkennungssequenz für das Restriktionsenzym *HindIII*, was – nach Subklonierung – gegebenenfalls die alleinige Expression von *mth60* ermöglichen sollte. Auf den nicht kodierenden Bereich folgen die Gensequenz von *mth59* sowie ein Terminator. Das Konstrukt I wurde von Life Technologies über die Restriktionsschnittstellen *NdeI* und *BamHI* in den Vektor pET-11a eingefügt.

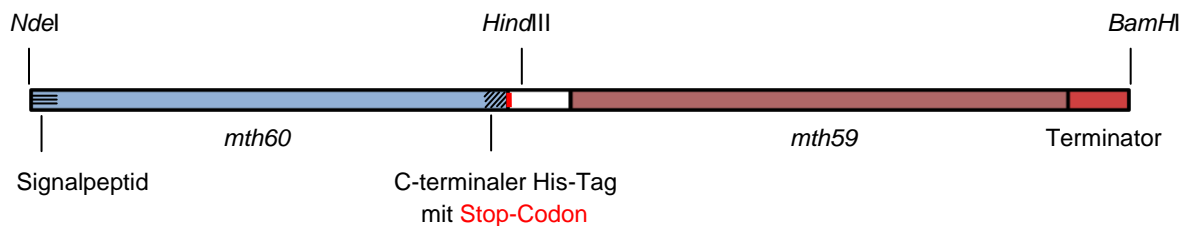


Abb. III.5: Schematische Darstellung des von Life Technologies synthetisierten Konstruktes I.

Die ersten Versuche zur Induktion der Genexpression wurden von Dr. Simone Schopf durchgeführt. Hierzu wurde das Plasmid mit Konstrukt I als Insert in *E. coli* BL21 Star(DE3) transformiert und zum Start der Genexpression mit 0,4 mM IPTG induziert. Die stärkste Expression wurde nach sechsständiger Inkubation bei 30°C erreicht, wobei nur eine verhältnismäßig schwache Zellyse verzeichnet wurde. Nach Isolierung der Proteine zeigte sich über SDS-PAGE, dass das gebildete rekombinante Mth60 in der unlöslichen, cytosolischen Fraktion enthalten war (Daten nicht gezeigt). Dieses Ergebnis stand im Einklang mit der lichtmikroskopischen Überprüfung der induzierten *E. coli*-Zellen, die in ihrem Inneren lichtbrechende Einschlusskörperchen (*inclusion bodies*) aufwiesen. Diese intrazellulären Aggregate stellen für *E. coli* eine Möglichkeit dar, hohe Mengen an unlöslichen Proteinen zu akkumulieren. Die äußerst stabilen *inclusion bodies* überstehen den mechanischen Zellaufschluss und werden erst durch denaturierende Agenzien wie Harnstoff solubilisiert.

Im Vergleich zu Mth60 konnte keine Expression des Proteins Mth59 detektiert werden. Weder in der löslichen noch in der unlöslichen Fraktion waren im SDS-Gel Zunahmen der Bandenintensitäten im Bereich von etwa 20 kDa zu verzeichnen. Dennoch wirkte sich die Expression von Mth60 nur vergleichsweise schwach toxisch auf *E. coli* aus. Ein möglicher Grund hierfür könnte – neben geringen Mengen an Mth59 – die Anpassung der Sequenz an die *codon usage* des Wirtsorganismus sein.

Nach Aufreinigung des rekombinanten Mth60 über Nickel-Affinitätschromatographie und Dialyse zur Entfernung des Harnstoffs zeigte sich im SDS-Gel überraschenderweise eine Doppelbande auf entsprechender Höhe (Abb. III.6 A). Mithilfe von anti-polyHistidin Antikörpern konnte im Western Blot gezeigt werden, dass sowohl das Protein bei etwa 16 kDa als auch jenes bei 18 kDa einen His-Tag aufwies (Abb. III.6 B). Eine weitere schwache Bande wurde auf Höhe von etwa 34 kDa detektiert, wobei es sich um ein Dimer handeln könnte. Die Analysen des 16 kDa- bzw. 18 kDa-Proteins über Edman-Abbau lieferten eindeutige Ergebnisse, entsprechend derer es sich um prozessiertes und nicht prozessiertes Mth60 handelte. So lautete die N-terminale Sequenz des 16 kDa-Proteins ATASQTVTV und stimmte mit Mth60 überein, dessen Signalpeptid abgespalten worden war (vgl. VI.2). Demnach war *E. coli* in der Lage das Protein in der gleichen Art und Weise zu prozessieren wie *M. thermoautotrophicus*. Die deutlich schwächere Bande bei 18 kDa hatte die N-terminale Sequenz MINMTEKLM. Abgesehen von der mittleren Aminosäure (T), bei der es sich um Arginin (R) handeln müsste, stimmte die Sequenz mit der nicht prozessierten Form von

Mth60 überein. Laut Prof. Deutzmann beruhte der Fehler bei der N-terminalen Ansequenzierung wohl auf dem allgemein schwachen Elektrotransfer der basischen Aminosäure Arginin auf die Blotmembran.

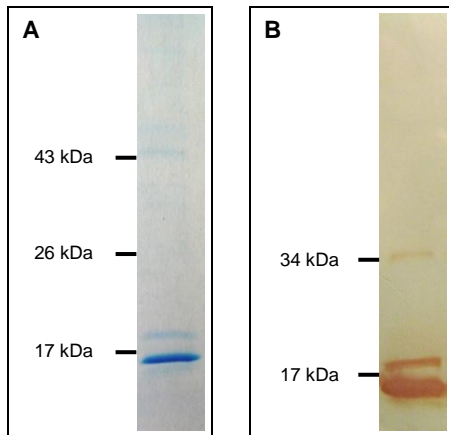


Abb. III.6: Analyse des durch Expression des Konstruktes I erhaltenen, rekombinanten Mth60 nach Aufreinigung über Nickel-Affinitätschromatographie. A: SDS-PAGE (12,5 % AA, Coomassie-gefärbt) zeigt eine Doppelbande bei etwa 17 kDa. B: Western Blot von A verdeutlicht, dass beide Proteine His-getaggt sind. 1° AK mouse anti-polyHistidin, 1:2.000; 2° AK goat anti-mouse, 1:2.000.

Aufgrund der Prozessierung stellte sich die Frage, ob *E. coli* in der Lage ist, das Protein ähnlich wie *M. thermoautotrophicus* nach außen zu sekretieren. Zu diesem Zweck wurde das zellfreie Medium nach der Zellernte einer PEG/NaCl-Fällung unterzogen. Diese verlief analog zur Präzipitation der Fimbrien (siehe II.5.1.3), lieferte allerdings im SDS-Gel keinerlei Proteinbanden im erwarteten Größenbereich. Aufgrund dieses Ergebnisses und der beobachteten *inclusion bodies* konnte davon ausgegangen werden, dass das Protein zwar prozessiert wird, aber dennoch intrazellulär lokalisiert ist.

Um das genannte Problem der Prozessierung zu umgehen, wurde Konstrukt II folgendermaßen synthetisiert (Abb. III.7): Die 33 Basen, die dem Signalpeptid von Mth60 entsprechen, wurden weggelassen und stattdessen die His-Tag-Sequenz N-terminal angefügt. Zwischen His-Tag und *mth60* befand sich zudem eine Thrombinschnittstelle, die eine Abspaltung des Tags nach erfolgreicher Aufreinigung ermöglichen sollte. Die intergene Region zwischen *mth60* und *mth59* wurde auf 18 Basenpaare reduziert und beinhaltete zudem eine Ribosomenbindestelle (rbs) für eine bessere Expression des (putativen) Chaperons. Die Klonierung erfolgte über die Schnittstellen *NcoI* und *BamHI*. Eine Erkennungssequenz für *HindIII* befand sich in der intergenen Region.

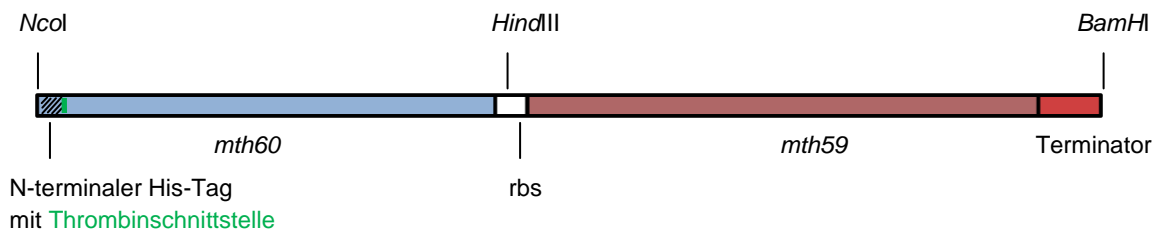


Abb. III.7: Schematische Darstellung des von Life Technologies synthetisierten Konstruktes II.

Konstrukt II wurde als Insert im Vektor pET-15b geliefert, welcher in *E. coli* BL21 Star(DE3) transformiert wurde. Die Genexpression erfolgte unter oben genannten Bedingungen. Auch in diesem Fall befand sich das rekombinante Mth60 in der unlöslichen cytosolischen Fraktion, konnte allerdings nicht an eine Nickel-Chelat-Säule binden. Vielmehr war das Protein im Durchlauf und der ersten Waschfraktion enthalten, wie durch Immundetektion mittels Antikörper, die gegen die Mth60-Fimbrien (siehe III.4.4) und damit hauptsächlich gegen Mth60 gerichtet waren, bestätigt wurde. Western Blots, in denen anti-polyHistidin Antikörper eingesetzt wurden, lieferten für die Elutionsfraktion ein kaum detektierbares Signal, so dass davon ausgegangen werden musste, dass der Histidin-Tag abgespalten worden war. Da ein Edman-Abbau zur Bestimmung der N-terminalen Sequenz des rekombinanten Proteins fehlschlug, wurde die eluierte Proteinlösung (trotz der sehr geringen Konzentration) an Eduard Hochmuth übergeben, der diese über eine Zip-Tip Pipettenspitze für die Analyse mittels MALDI-TOF vorbereitete. Dabei stellte sich heraus, dass zwei Proteine äquimolar enthalten waren: Neben einem Protein mit einer errechneten Molekularmasse von etwa 16,8 kDa, die dem His-getaggten Mth60 entspricht, konnte ein weiteres Protein mit 14,7 kDa ausgemacht werden. Dabei handelt es sich in etwa um die errechnete molekulare Masse des rekombinanten Mth60 ohne Signalsequenz und ohne His-Tag (14,9 kDa). Demnach war *E. coli* – trotz des Fehlens der vollständigen Erkennungssequenz für die Signalpeptidase – in der Lage, den His-Tag an der Stelle abzuspalten, an der Mth60 im ursprünglichen Organismus prozessiert wird. Da über die Nickelsäule nur His-getaggte Proteine aufgereinigt werden können und das Eluat auch das nicht-getaggte Protein in gleichen Mengen enthielt, war davon auszugehen, dass die Abspaltung des His-Tags selbst nach erfolgter Aufreinigung noch stattfand.

Aufgrund des fehlenden His-Tags war es nicht möglich, das Protein in größeren Mengen über Nickel-Säulen aufzureinigen. Auch der Versuch zur Aufreinigung über anti-Mth60-Fimbrien Antikörper, die an einer NHS-aktivierten Agarosesäule immobilisiert worden waren, misslang. Obwohl ca. 50 mg Antikörper nachweislich an die Säulenmatrix gebunden hatten, war das rekombinante Mth60 allein im Durchlauf zu finden, wie entsprechende Western Blots aufzeigten. Auch die Versuche, Konstrukt II in den *E. coli*-Stämmen BL21(DE3)pLysS bzw. BL21-CodonPlus(DE3)-RIPL zu exprimieren, resultierten in gleichermaßen prozessiertem Mth60. Zudem wurde im Fall von *E. coli* BL21-CodonPlus(DE3)-RIPL eine vermehrte Lyse der Zellen beobachtet.

Da eine Aufreinigung des Mth60, das durch Expression des Konstruktes II entstanden war, unmöglich erschien, wurde in Folge mit Konstrukt I weitergearbeitet. Das dadurch erhaltene Mth60 wurde vor allem in Co-Immunpräzipitationen (siehe III.6.1.1) sowie Polymerisationsstudien (siehe III.7) eingesetzt. Allerdings muss hierbei bedacht werden, dass das resultierende Protein stets mit einem nicht abspaltbaren, C-terminalen His-Tag versehen war und im SDS-Gel aufgrund der Prozessierung als Doppelbande sichtbar wurde.

Da zum Zeitpunkt dieses Ergebnisstandes bereits Antikörper gegen die Mth60-Fimbrien generiert worden waren (siehe III.4.4) und davon ausgegangen werden konnte, dass sich diese in erster Line gegen das Hauptfimbrien Mth60 richteten, wurde von einer Herstellung spezifischer Antikörper gegen das rekombinante Protein abgesehen.

3.3 Klonierung und Expression von *mth59* sowie Antikörpergenerierung

Zur Klonierung des vermeintlichen Chaperons Mth59 wurde das zugehörige Gen unter Verwendung entsprechender Primer (siehe II.1.5) über PCR amplifiziert. Die optimale Annealingtemperatur wurde über einen Temperaturgradienten bestimmt und betrug zwischen 55° und 60°C. Das PCR-Produkt wurde in den Vektor pET-14b kloniert und dieser in *E. coli* DH5α transformiert. Nach Überprüfung auf Sequenzrichtigkeit erfolgte die Transformation in *E. coli* BL21 Star(DE3) sowie die Induktion der Genexpression mit 0,4 mM IPTG. Dabei zeigte sich, dass das rekombinante Protein mit einer Molekularmasse von etwa 22 kDa ausschließlich in der unlöslichen, cytosolischen Fraktion enthalten war und die maximale Menge nach sechsständiger Inkubation bei 30°C gewonnen werden konnte (Daten nicht gezeigt). Auch hier bestätigte die lichtmikroskopische Untersuchung der induzierten Zellen die Bildung von *inclusion bodies*.

Western Blots zum Nachweis eines His-getaggten rekombinanten Proteins gestalteten sich zunächst schwierig, da Mth59 mit dem standardmäßig verwendeten Towbin-Transferpuffer nicht auf die PVDF-Membran übertragen werden konnte. Grund dafür war vermutlich die starke Basizität des Proteins, das einen isoelektrischen Punkt von 9,9 aufweist. Um den Elektrotransfer zu verbessern, wurden zwei verschiedene Puffer alternativ zum Towbin-Puffer getestet. Dabei handelte es sich erstens um einen Puffer mit der Zusammensetzung 10 mM CAPS, 10 % MeOH, pH 11 (Matsudaira, 1987) und zweitens mit 10 mM NaHCO₃, 3 mM Na₂CO₃, 20 % MeOH, pH 10 (Dunn, 1986). Mit beiden Puffern erfolgte nur ein geringer Transfer, der durch Coomassie- bzw. Ponceau-Färbung der Membran visualisiert werden konnte. Das beste Resultat wurde dagegen durch eine Modifikation des gängigen Towbin-Puffers erzielt, indem der Methanolgehalt von ursprünglich 20 auf 10 % reduziert und der pH auf etwa 10,5 eingestellt wurde. In Folge wurden alle Western Blots dieses Proteins unter Verwendung des modifizierten Towbin-Puffers durchgeführt. Auch wenn damit die bestmöglichen Ergebnisse erzielt wurden, sei hier erwähnt, dass sich die Effizienz der Übertragung auf die PVDF-Membran nicht mit der von anderen Proteinen vergleichen ließ. Die Immunmarkierung eines Western Blots mit anti-polyHistidin Antikörpern bestätigte, dass die prominente Proteinbande bei 22 kDa ein His-getaggtes Protein darstellte. Nach der Aufreinigung über Affinitätschromatographie und dem Austauschen des harnstoffhaltigen Elutionspuffers gegen 5 mM HEPES wurde die Effizienz der Aufreinigung über SDS-PAGE überprüft (Abb. III.8 A). Dass es sich bei der dominanten Bande tatsächlich um Mth59 handelte, wurde über MALDI-TOF MS/MS-Analyse bestätigt. Da dieses Protein aus dem

SDS-Gel ausgeschnitten und für eine Antikörpergenerierung verwendet wurde (siehe unten), erfolgte keine Klärung der Identität der schwachen Bande bei ca. 45 kDa.

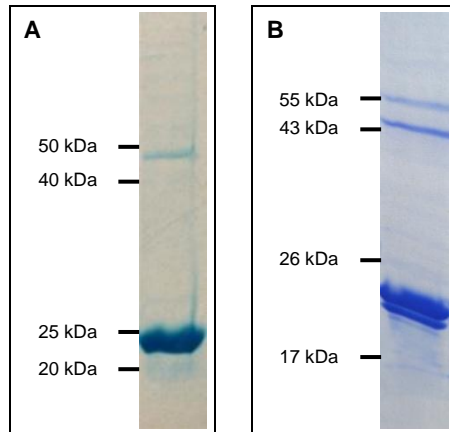


Abb. III.8: Analyse des rekombinanten Mth59 nach Aufreinigung über Nickel-Affinitätschromatographie. SDS-PAGEs (12,5 % AA, Coomassie-gefärbt) der Elutionsfraktionen zweier Aufreinigungen. A: Die erste Aufreinigung zeigt Mth59 als dominante Proteinbande auf Höhe von etwa 22 kDa. B: Die zweite Aufreinigung zeigt eine Doppelbande auf Höhe von Mth59 sowie weitere höhermolekulare Proteine.

In allen darauffolgenden, unter identischen Bedingungen durchgeführten Expressionen von Mth59 ließen sich im SDS-Gel nach der Aufreinigung eine Doppelbande auf Höhe von etwa 22 kDa, sowie zwei weitere schwache Banden bei ca. 45 und 55 kDa erkennen (Abb. III.8 B). Da Mth59 vor allem für Co-Immunpräzipitationen eingesetzt werden sollte, wurden diese Proteine über Massenspektrometrie bestimmt. Dabei zeigte sich, dass beide Banden im Bereich von 22 kDa eindeutig Mth59 darstellten. Über Western Blot wurde ermittelt, dass beide Proteine einen N-terminalen His-Tag aufwiesen und es demnach zu einem teilweisen Verlust des C-terminalen Endes der Sequenz gekommen sein musste (Daten nicht gezeigt). Die beiden höhermolekularen Proteine konnten als die *E. coli*-Proteine Tagatose-6-Phosphat-Kinase und Translations-Elongationsfaktor Tu identifiziert werden. Nach einer erneut durchgeführten Nickel-Chelat-Affinitätschromatographie waren diese beiden Banden verschwunden.

Rekombinantes Mth59 aus Abb. III.8 A wurde zur Immunisierung eines Kaninchens herangezogen, dessen Präimmunsrum im Vorfeld keine Reaktion mit dem Protein zeigte. Nach insgesamt drei Booster-Injektionen wurde der Titer des Antiserums im Western Blot auf 1:10.000 und im Dot Blot auf 1:30.000 bestimmt. Die Antikörper vom Typ IgG wurden über eine Protein G Säule an der ÄKTA aufgereinigt und wiesen eine Konzentration von 10 mg/ml auf. Der Erfolg dieser Aufreinigung zeigte sich im SDS-Gel durch Vergleich mit dem nicht aufgereinigten Immunsrum. Dabei war die prominente Serumalbumin-Bande bei etwa 70 kDa verschwunden, während ausschließlich die typischen IgG-Banden bei 50 kDa (schwere Ketten) und 25 kDa (leichte Ketten) sichtbar waren. Die Abbildung zur Aufreinigung und Analyse der Mth59-Antikörper findet sich im Anhang (siehe VI.4, Abb. VI.1).

Aufgrund der Probleme beim Elektrotransfer von Mth59 auf Membranen wurden Immunmarkierungen an Western Blots mit einer maximalen Verdünnung von 1:5.000 durchgeführt.

3.4 Klonierung und Expression von *mth61*

Das Gen *mth61* konnte mit dem entsprechenden Primerpaar bei allen Annealing-temperaturen zwischen 55° und 60°C in gleichem Maße amplifiziert werden. Das PCR-Produkt wurde in den Vektor pET-14b ligiert und nach Bestätigung einer fehlerfreien Sequenz in *E. coli* BL21 Star(DE3) transformiert. Bei diesem Expressionsstamm konnte aufgrund der unter III.3.1 gemachten Beobachtungen davon ausgegangen werden, dass er die besten Resultate liefert. Zur Induktion der Genexpression wurde IPTG in einer Endkonzentration von 0,5 mM zugegeben und die Kultur bei 23°C inkubiert, wobei zu unterschiedlichen Zeitpunkten Proben entnommen wurden. Dabei fiel auf, dass das Medium vor allem nach Inkubation über Nacht sehr viskos wurde, was auf einen hohen Anteil an extrazellulärer DNA und damit auf eine Lyse der Zellen schließen ließ. Lichtmikroskopische Untersuchungen der Zellen bestätigten diese Vermutung, so dass von einer toxischen Wirkung des rekombinanten Proteins auf *E. coli* ausgegangen werden musste. Tatsächlich konnten über SDS-PAGE in keiner der Proben Proteine in der erwarteten Größenordnung von etwa 20 kDa detektiert werden. Der immunologische Nachweis über anti-polyHistidin Antikörper zeigte eine sehr schwache, kaum noch detektierbare Bande in den Proben der unlöslichen Fraktionen, die zwischen 3 h und über Nacht induziert worden waren. Trotz zahlreicher Versuche gelang es nicht, die Menge an rekombinantem Protein zu erhöhen. Auch das Ersetzen des Ampicillins durch Carbenicillin (200 µg/ml), einem Antibiotikum, das deutlich stabiler gegen die von den Bakterien sekretierte β -Lactamase ist und den Selektionsdruck länger aufrecht erhält, blieb erfolglos. Aus Zeitgründen musste von weiteren Bemühungen zur erfolgreichen Expression dieses Proteins abgesehen werden.

3.5 Klonierung und Expression von *mth58*

Das über PCR amplifizierte *mth58* wurde in pET-14b ligiert und in *E. coli* BL21 Star(DE3) transformiert. Zur Induktion der Genexpression wurden verschiedene Bedingungen überprüft, wie z.B. IPTG-Konzentrationen zwischen 0,4 und 1 mM und Inkubationstemperaturen von 20° bis 37°C. Dabei konnte nach elektrophoretischer Auftrennung in keinem der zu unterschiedlichen Zeitpunkten entnommenen Aliquots eine Zunahme der Bandenintensität im erwarteten Bereich von 14 kDa ausgemacht werden. Da diese Aussage vor allem im Fall der löslichen cytosolischen Proteinfraction, die aufgrund des Zellaufschlusses eine große Menge des 14 kDa großen Proteins Lysozym enthielt, schwer zu treffen war, wurden Western Blots durchgeführt. Diese erfolgten aufgrund einer ähnlich hohen Basizität (isoelektrischer Punkt von 9,3) wie im Fall des Proteins Mth59 sowohl unter Verwendung des gängigen, als auch des modifizierten Towbin-Puffers. Dabei konnten keinerlei His-getaggte Proteine detektiert werden, weswegen aus Zeitgründen auf weitere Versuche zur Gewinnung von rekombinantem Mth58 verzichtet wurde.

3.6 Expression der Pseudomurein-Endoisozeptidase PeiP

Die Pseudomurein-Endoisozeptidase PeiP wurde für den Aufschluss von Zellen sowie für das Herauslösen von Fimbrien aus der Zellwand eingesetzt. Zu Beginn der Arbeit lag PeiP als Insert im Expressionsvektor pET-28a vor und war als Glycerinkultur im *E. coli* Stamm BL21(DE3):pME2508 hinterlegt. Die Induktion der Genexpression erfolgte über Zugabe von 0,2 mM IPTG und 12-stündiger Inkubation bei 30°C. Das rekombinante Protein mit einer Molekularmasse von 38 kDa konnte in großen Mengen aus der löslichen cytosolischen Fraktion isoliert und über Nickel-Affinitätschromatographie aufgereinigt werden (Daten nicht gezeigt).

4 Charakterisierung der Mth60-Fimbrien von *M. thermoautotrophicus*

4.1 Isolierung und Analyse der Fimbrien

Für diese Arbeit war es zwingend notwendig, die Fimbrien von *M. thermoautotrophicus* in großen Mengen zu isolieren, weswegen verschiedene Vorgehensweisen getestet wurden.

4.1.1 Isolierung aus dem Zellpellet mittels Ultra-Turrax

Bei dieser Methode zur Isolierung der Fimbrien handelte es sich um die bis zu diesem Zeitpunkt im Labor der AG Prof. Wirth verwendete Standardprozedur. Dabei wurden die Zellen eines 100 l Fermenters durch Zentrifugation geerntet und anschließend die Zellan-hänge mit dem Ultra-Turrax abgeschert (Thoma, 2005). Die weitere Aufreinigung erfolgte über differentielle Zentrifugation sowie CsCl-Dichtegradientenzentrifugation. Mit dieser Methode konnten in der Vergangenheit 10 µg Fimbrien aus 100 l Kultur isoliert werden (Thoma *et al.*, 2008). Dabei wurde damals nicht mit dem bei der DSMZ hinterlegten Stamm *M. thermoautotrophicus* DeltaH, sondern mit dem Stamm AG5 gearbeitet, der eine höhere Anzahl an Fimbrien ausbildet. Laut TEM-Untersuchungen weisen etwa 50-60 % der planktonisch gewachsenen AG5-Zellen Fimbrien auf, im Fall von DeltaH handelt es sich dabei lediglich um etwa 5 % der Zellen (Thoma, 2005).

Nichtsdestotrotz sollten in dieser Arbeit die Fimbrien von *M. thermoautotrophicus* DeltaH isoliert werden, da dessen Genom sequenziert (Smith *et al.*, 1997) und in der Datenbank hinterlegt ist. Der Versuch zur Isolierung der Fimbrien aus 100 l Kultur über Ultra-Turrax blieb erfolglos. Auch wenn auf eine möglichst „sanfte“ Zellernte bei 7.800 x g (Heraeus-Durchlauf-zentrifuge) geachtet wurde, so konnte nach der isopyknischen Zentrifugation keine Bande im Ultrazentrifugen-Röhrchen ausgemacht werden. Die Vermutung, dass die 5 nm dünnen Fimbrien sehr empfindlich sind und durch die bei der Zellernte auf sie einwirkenden Scherkräfte abbrechen, bestand bereits aufgrund der geringen Fimbrien-Ausbeute im Fall von *M. thermoautotrophicus* AG5. Aus diesem Grund wurde der Zentrifugationsüberstand des Fermentes aufgefangen und auf das Vorhandensein von Fimbrien hin untersucht.

4.1.2 Isolierung aus dem Zentrifugationsüberstand über PEG-Fällung

Die im Kulturüberstand eines 100 l Fermenters enthaltenen Proteine wurden mit PEG präzipitiert und anschließend über differentielle und isopyknische Zentrifugation aufgereinigt. Dabei wurden die in der Probe enthaltenen Makromoleküle entsprechend ihrer Sedimentationsgeschwindigkeit aufgetrennt und bildeten bis zu neun verschiedene, mehr oder weniger deutlich voneinander abgegrenzte, weiße Banden. Aufgrund der großen Mengen an PEG war die gesamte Lösung sehr trüb und die entstandenen Banden nur sehr schwer zu erkennen, so dass jeder Versuch einer Fotodokumentation unbefriedigende Ergebnisse lieferte. Die Banden (Fraktionen) wurden abgenommen, zur Eliminierung des PEG dialysiert und über SDS-PAGE untersucht (Abb. III.9). Dabei konnten die Fimbrien enthaltenden Fraktionen 5 und 6 eindeutig über die Bande bei 16 kDa identifiziert werden, die dem Hauptfimbrien Mth60 entspricht. Durch die einzelne, scharf abgegrenzte Bande konnte davon ausgegangen werden, dass die Fimbrien erfolgreich aufgereinigt wurden. In den restlichen Fraktionen konnten keine Proteine nachgewiesen werden.

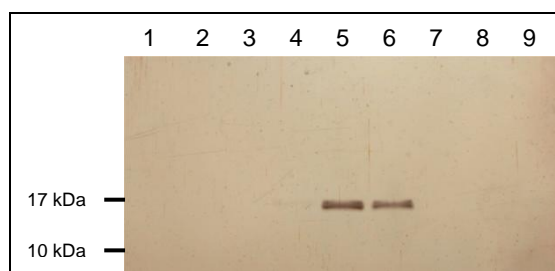
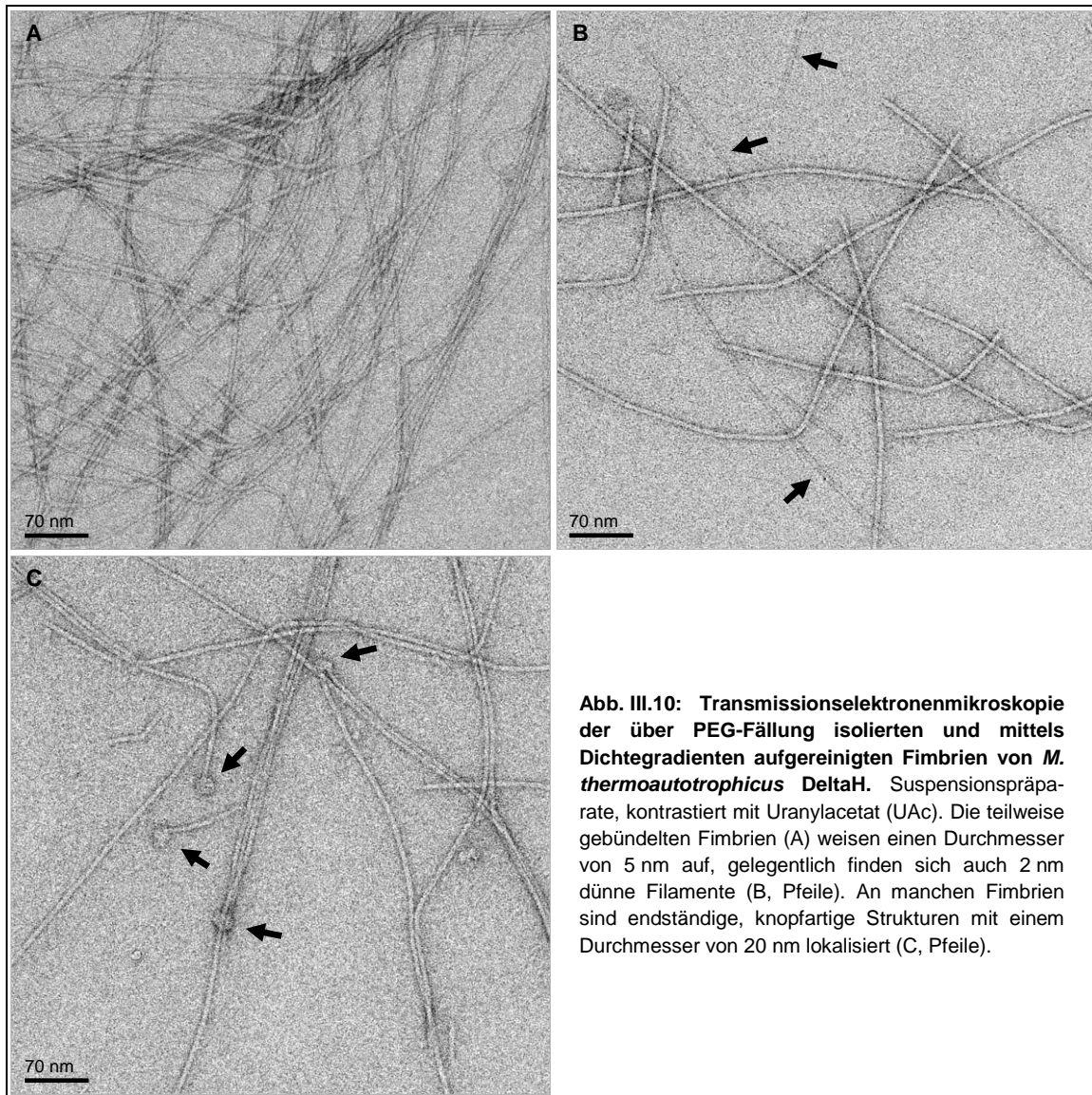


Abb. III.9: Analyse der neun Fraktionen aus der CsCl-Dichtegradientenzentrifugation nach PEG-Fällung des Fermenterüberstandes von *M. thermoautotrophicus* DeltaH. SDS-PAGE (12,5 % AA, silbergefärbt). Fraktionen 5 und 6 enthalten Proteine mit einer Molekularmasse von etwa 16 kDa, der Größe des Hauptfimbriins Mth60.

Zusätzlich zur SDS-PAGE erfolgten elektronenmikroskopische Untersuchungen der neun Fraktionen anhand von Suspensionspräparaten. Diese bestätigten die erhaltenen Ergebnisse und zeigten, dass Fraktionen 5 und 6 eine Vielzahl an Fimbrien enthielten. Während diese in Fraktion 5 einen hohen Reinheitsgrad aufwiesen (Abb. III.10) waren in Fraktion 6 einige nicht näher definierbare Verunreinigungen zu finden (Daten nicht gezeigt). Die isolierten Fimbrien waren in der Regel lang, gut strukturiert und lagen wie aus Abb. III.10 A hervorgeht zum Teil gebündelt vor. Sie wiesen den typischen Durchmesser von 5 nm auf, allerdings konnten gelegentlich auch dünnere Filamente mit einem Durchmesser von etwa 2 nm beobachtet werden (Abb. III.10 B, Pfeile). Auffällig an einigen Enden der Fimbrien waren knopfartige Strukturen mit einem Durchmesser von ca. 20 nm (Abb. III.10 C, Pfeile). Aufgrund der Präparation ist keine Aussage möglich, ob es sich dabei um die Endstücke der Fimbrien oder um aus der Zellwand herausgelöste Verankerungsstrukturen handelt.



Die elektronenmikroskopischen Aufnahmen der Fimbrien wurden herangezogen, um die Filamente auf Periodizitäten, also Wiederholungen spezifischer Abschnitte, hin zu untersuchen. Dabei wurden gut schwermetallkontrastierte Bereiche der Fimbrien im EM-Menü 4.0 maskiert und die Powerspektren auf Reflexe hin untersucht. Es konnten jedoch keinerlei Signale ausgemacht werden.

Die Mikroskopie der restlichen Fraktionen des CsCl-Dichtegradienten zeigte, dass diese so gut wie keine Fimbrien enthielten. In Fraktionen 1 bis 4 waren zwar zunehmend mehr Fimbrien(fragmente) zu beobachten, allerdings in sehr geringer Anzahl. Die wenigen in den Fraktionen 7 bis 9 enthaltenen Fimbrien waren an Zellfragmente oder Zellwandfetzen gebunden (Daten nicht gezeigt). Andersartige Strukturen konnten in keiner dieser Fraktionen ausgemacht werden. Dieses Ergebnis deckt sich mit dem der SDS-PAGE, wonach in allen oben genannten Fraktionen keine Proteine detektiert werden konnten. Vermutlich handelte es sich bei den im Dichtegradienten entstandenen Banden um Lipide, DNA oder Medienbestandteile.

Aufgrund der erhaltenen Ergebnisse wurden die Fimbrien von *M. thermoautotrophicus* in Folge stets aus dem Zentrifugationsüberstand eines 100 l Fermenters isoliert. Dabei wurde die Zellernte mit der Padberg-Durchlaufzentrifuge bei $16.500 \times g$ durchgeführt, um die höchstmögliche Ausbeute zu gewährleisten. Die gesamte Proteinmenge an Fimbrien, die aus dem Überstand eines Fermenters gewonnen werden konnte, betrug in etwa 1,6 mg.

4.1.3 Isolierung aus dem Zellpellet mittels Pseudomuramidase PeiP

Die Möglichkeit, Fimbrien über Behandlung der Zellen mit dem Enzym Pseudomurein-Endoisopeptidase (PeiP) zu isolieren, ergab sich aus dem Versuch, Zellen auf diesem Wege aufzuschließen, um intrazelluläre Proteine zu isolieren (siehe III.6.1.1). Dabei zeigten TEM-Untersuchungen dieser „Zellaufschlüsse“ trotz der geringen Kulturmenge von 750 ml eine Vielzahl an Fimbrien. Erstaunlich war die Tatsache, dass das Zellpellet trotz Zentrifugation bei $13.100 \times g$ noch zahlreiche zellassoziierte Fimbrien(fragmente) enthielt, die durch Zerstörung der Zellwand aus dieser freigesetzt wurden. Allerdings sei hier erwähnt, dass es sich bei diesem Experiment um den Stamm AG5 handelte, der um ein Vielfaches mehr Fimbrien ausbildet als *M. thermoautotrophicus* DeltaH.

Zur Aufreinigung der Fimbrien wurde die Probe in eine CsCl-Dichtegradientenzentrifugation eingesetzt. Die drei resultierenden, sehr schwachen und diffusen Banden (Abb. III.11 A) wurden abgenommen und analysiert. Elektronenmikroskopische Untersuchungen zeigten, dass die Fimbrien in der obersten Bande (Fraktion 1) des Gradienten enthalten waren. Wie aus Abb. III.11 B hervorgeht, waren neben den 5 nm dicken Fimbrien auch hier dünnere Strukturen zu finden. Aufgrund einer relativ starken Verunreinigung der Fimbrienfraktion konnte keine Aussage über potentielle Endstrukturen getroffen werden.

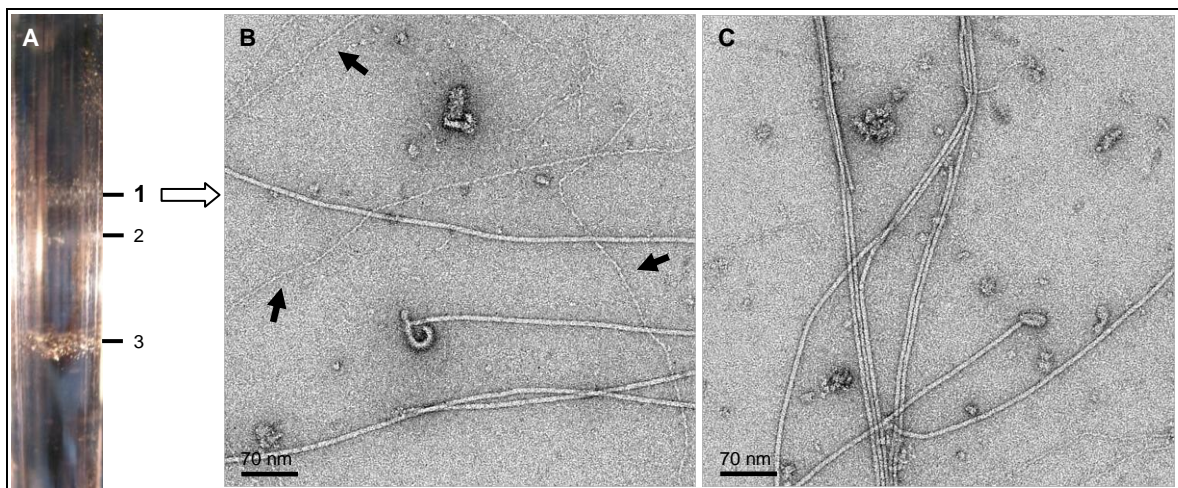


Abb. III.11: Analyse der Fimbrien-Isolierung von *M. thermoautotrophicus* AG5 über proteolytischen Verdau der Zellwand mit PeiP. A: Ultrazentrifugen-Röhrchen nach CsCl-Dichtegradientenzentrifugation zeigt drei Banden. B+C: TEM-Aufnahmen der Bande 1 aus A. Suspensionspräparate, kontrastiert mit UAc. Die Fraktion enthält 5 nm dicke Fimbrien, dünnere Filamente (Pfeile) sowie zahlreiche Verunreinigungen.

Durch SDS-PAGE der Fimbrien enthaltenden Fraktion zeigten sich neben der erwarteten Mth60-Bande eine zusätzliche Bande bei etwa 20 kDa sowie ein „Schmier“ an der Grenze zwischen Sammel- und Trenngel (Abb. III.12). Aufgrund der unreinen Fimbrienfraktion ist unklar, ob die Proteine bei 20 kDa Fimbrine darstellen.

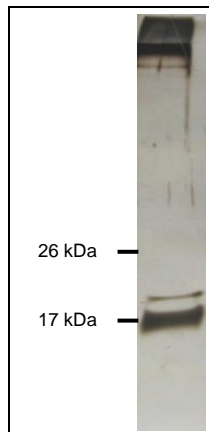


Abb. III.12: Analyse der über PeiP isolierten und aufgereinigten Fimbrien von *M. thermoautotrophicus* AG5. SDS-PAGE (12,5 % AA, silbergefärbt). Die Fimbrien enthaltende Fraktion 1 aus Abb. III.11 zeigt neben der prominenten Bande bei etwa 17 kDa eine weitere Bande bei ca. 20 kDa sowie einen „Schmier“ an der Grenze zwischen Sammel- und Trenngel.

Trotz der Verunreinigungen stellte diese Methode eine gute Möglichkeit dar, Fimbrien schnell und einfach zu isolieren und wurde deswegen für die Isolierungen der Zellanhänge von *Methanothermobacter marburgensis* und *Methanothermobacter fervidus* verwendet (siehe III.5.1.2 und III.5.2.2).

4.2 Versuche zur Identifizierung weiterer Fimbrienproteine

Mth60 ist als Hauptbestandteil der Fimbrien von *M. thermoautotrophicus* das einzig bekannte Fimbrin. Da über PEG-Fällung Fimbrien in ausreichender Menge gewonnen werden konnten, wurden zur Analyse ihrer Proteinzusammensetzung 7 µg in eine SDS-PAGE eingesetzt. Dabei zeigten sich neben der dominanten Mth60-Bande weitere schwache Banden (Abb. III.13). Anhand der Länge der Wanderstrecke im SDS-Gel konnten den Proteinen Massen von etwa 27, 19 und 17 kDa zugewiesen werden, wobei letzteres Protein nicht von der Mth60-Bande abgegrenzt erschien.

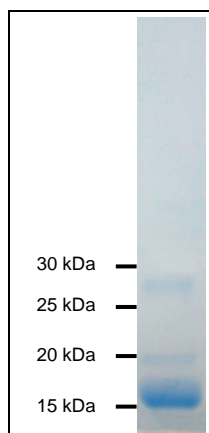


Abb. III.13: Elektrophoretische Auftrennung einer größeren Menge (7 µg) der über PEG-Fällung gewonnenen Fimbrien von *M. thermoautotrophicus* DeltaH. SDS-PAGE (12,5 % AA, Coomassie-gefärbt). Neben der dominanten Bande bei etwa 15 kDa, die das Hauptfimbrin Mth60 darstellt, finden sich weitere, sehr schwache Banden (durch Pfeile markiert).

Es wurden zahlreiche Versuche zur Identifizierung dieser Proteine unternommen, bei denen es sich vermutlich um weitere Bestandteile der Fimbrien handelt. Da eine Bestimmung der N-

terminalen Sequenzen über Edman-Abbau aufgrund der geringen Proteinmengen nicht möglich war, sollten die Proteine im Gel hydrolysiert und die Peptide über MALDI-TOF MS/MS identifiziert werden. Hierzu wurde mit Trypsin, Chymotrypsin und der Endoproteinase Glu-C gearbeitet, wobei jedoch all diese Versuche fehlschlagen. Laut Eduard Hochmuth erweckten die MALDI-Analysen den Eindruck, dass die ausgeschnittenen Gelbanden mit Ausnahme von Keratinen keinerlei Proteine enthielten. Ein negativer Einfluss etwaiger PEG-Reste auf die Massenspektrometrie konnte ausgeschlossen werden, da auf gleiche Weise behandeltes BSA problemlos identifiziert werden konnte. Die Verunreinigung der Proben mit Keratinen lässt sich durch die Vorgehensweise bei der Fimbrienisolierung erklären: Die 50 l Kunststoffbehälter, in denen die PEG-Fällung der Fimbrien stattfand, waren weder sterilisiert noch von Proteinresten befreit.

Ebenfalls ohne Ergebnisse blieb der Versuch, die Gelstücke vor Enzymzugabe 30 min bei 80°C zu inkubieren. Dies sollte gegebenenfalls eine minimale Denaturierung der thermophilen Proteine unterstützen und den Proteasen damit eine verbesserte Angriffsfläche bieten. Als weitere Möglichkeit bot sich LC/MS an, eine Methode, die auf einer Kopplung aus Flüssigchromatographie und Massenspektrometrie beruht. Damit können die in einer Probe enthaltenen Proteine identifiziert werden, wenn auch keine Zuordnung zu den Proteinbanden und keine Aussage über den mengenmäßigen Anteil der einzelnen Proteine möglich ist. Für die Analyse wurden bis zu 10 µg der Fimbrienlösung 30 min bei 80°C inkubiert, nach Abkühlung mit Trypsin versetzt und die Spaltung über Nacht durchgeführt. Der Erfolg des Verdauens konnte im SDS-Gel durch das Verschwinden der Proteinbanden verfolgt werden. Die entstandenen Peptide wurden über HPLC aufgetrennt und massenspektrometrisch untersucht. Dabei konnte Mth60 mit einem Score von 104 identifiziert werden. Dieser relativ schlechte Wert beruht darauf, dass nur zwei Peptide des Proteins detektiert wurden, was sich durch die geringe Größe von Mth60 erklären lässt. Weitere „Treffer“ waren Mth1350 (Flavoprotein AI, 46 kDa, Score 345), Mth1351 (hypothetisches Protein, 15 kDa, Score 156) sowie weitere Proteine aus *M. thermoautotrophicus* mit einem nicht signifikanten Score-Wert von unter 80. Zwischen diesen Proteinen befanden sich nur wenige mit einer molekularen Masse zwischen 15 und 30 kDa, wobei es sich dann um hypothetische Proteine handelte, deren kodierende Sequenzen weit von *mtb60* entfernt lokalisiert sind. Die erwarteten Proteine Mth58 bzw. Mth61 konnten nicht detektiert werden, genauso wenig Mth59. Die vollständigen über LC/MS erhaltenen Daten finden sich auf der Begleit-CD (siehe VI.5).

4.3 Elektronenmikroskopie der Fimbrien adhärenter Zellen

4.3.1 Transmissionselektronenmikroskopie

In einigen Fällen konnten an den aufgereinigten Fimbrien von *M. thermoautotrophicus* endständige, knopfartige Strukturen ausgemacht werden (siehe III.4.1.2). Da unklar war, an welchem Ende der Zellanhänge sich diese Strukturen befinden, sollte der Organismus auf kohlebeschichtete Gold-Grids kultiviert und die Fimbrien im TEM analysiert werden. Dabei war bereits bekannt, dass *M. thermoautotrophicus* mit seinen Zellanhängen gut an diese Oberfläche adhäriert (Abb. III.14 A). Um eine möglichst große Anzahl an Mth60-Fimbrien untersuchen zu können, wurden diese Versuche mit dem Stamm AG5 durchgeführt.

Zwar konnten einzelne Fimbrien auf den Grids gefunden, diese jedoch nicht bis zur zugehörigen Zelle zurückverfolgt werden. Auffällig war aber, dass ausgehend von den Zellkörpern keine Fimbrien zu finden waren, mit Ausnahme der Zelle in Abb. III.14 B, deren Fimbrie allerdings gerissen zu sein scheint (Pfeile). Dies zeigt erneut die Empfindlichkeit der Zellanhänge auf, die trotz vorsichtiger Handhabung der Grids (sanftes Eintauchen in MS-Waschpuffer bzw. H₂O zur Befreiung von Unreinheiten) abbrechen.

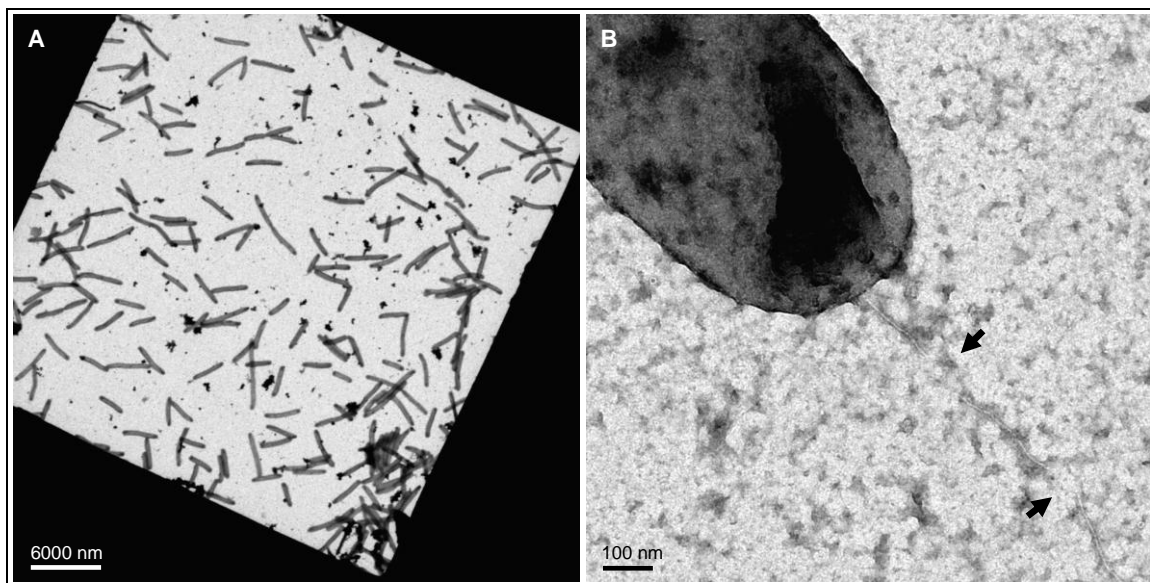


Abb. III.14: TEM-Aufnahmen von *M. thermoautotrophicus* AG5 nach Aufwuchs auf kohlebeschichtete Gold-Grids. Kontrastierung mit UAc. A: an Kohlefilm adhärenende Zellen. B: Zelle, aus deren Zellpol eine Fimbrie entspringt. Die Pfeile zeigen auf Stellen, an denen der Zellanhang gerissen scheint.

An den Enden der frei auf dem Kohlefilm liegenden Fimbrien wurden keinerlei knopfartige Strukturen gefunden. Im Gegensatz zu den Knöpfen konnten allerdings zahlreiche andere endständige Strukturen ausgemacht werden. Dabei handelte es sich um „Golfschläger“- bzw. „Haken“-förmige Ausbuchtungen der Fimbrien (Abb. III.15). Die Maße dieser Ausbuchtungen betrugen zwischen 60 nm (A) und etwa 150 nm (C, D, F) in der Länge und durchschnittlich etwa 20 nm in der Breite. Trotz Verunreinigung der Grids war meist klar ersichtlich, dass die endständigen Strukturen Teil der Fimbrien waren und keine Artefakte darstellten, die lediglich an den Fimbrien gebunden hatten.

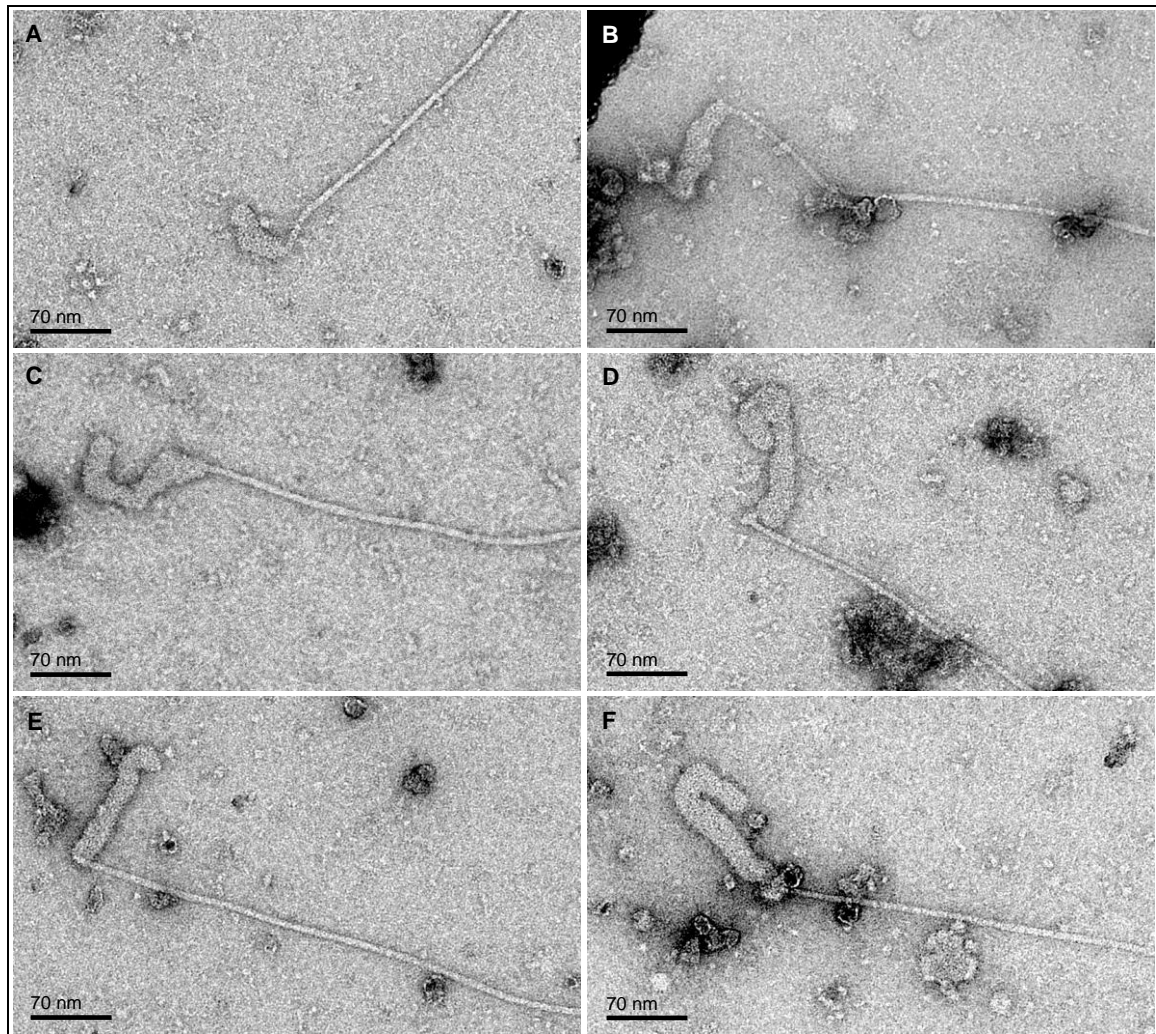


Abb. III.15: TEM-Aufnahmen endständiger Ausbuchtungen an „freien“ Fimbrien von *M. thermoautotrophicus* AG5. Bewachsene, kohlebeschichtete Gold-Grids, kontrastiert mit UAc. Die Lokalisation und Funktion der Ausbuchtungen sind unklar, da die Fimbrien nicht mehr zellassoziiert vorlagen.

Wie bei den knopfartigen Strukturen sind auch hier die Lokalisierung und damit die mögliche Funktion dieser Fimbrien-Ausbuchtungen unklar. In der Nähe eines Zellpols wurde eine Stelle gefunden, an der scheinbar eine solche Ausbuchtung in die Zellwand hineinragt (Abb. III.16). Allerdings könnte es sich dabei auch um eine zufällige Überlagerung einer nicht zellassoziierten Fimbrie mit einer Zelle handeln.

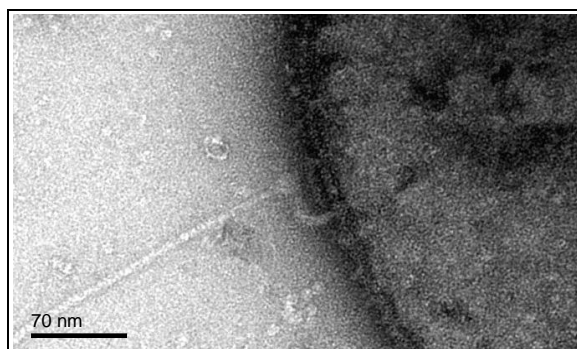


Abb. III.16: TEM-Aufnahme einer potentiellen Verankerungsstruktur einer Fimbrie von *M. thermoautotrophicus* AG5. Bewachsenes, kohlebeschichtetes Gold-Grid, kontrastiert mit UAc.

An den Zellpolen der adhärennten *M. thermoautotrophicus*-Zellen konnten – im Gegensatz zu Fimbrien – andere einzigartige und bislang unbeobachtete Strukturen entdeckt werden. Sie zeichneten sich durch eine regelmäßige Anordnung aus, die an eine Leiter erinnerte und hatten einen Durchmesser von 13-14 nm. Abb. III.17 zeigt eine Auswahl der TEM-Aufnahmen, aus denen hervorgeht, dass die Strukturen an den Zellpolen lokalisiert sind und leicht abbrechen (A, Pfeil) wodurch sie auch frei auf dem Kohlefilm zu finden sind (B+C, Pfeile). Da diese „leiterähnlichen“ Strukturen wiederholt und unabhängig davon auftraten, ob die Grids vor der Kontrastierung sanft in H₂O oder MS-Waschpuffer geschwenkt wurden, sind Artefakte unwahrscheinlich. Zudem geht vor allem aus Abb. III.17 C hervor, dass die Strukturen im Zellinneren entspringen (farbig gekennzeichnet).

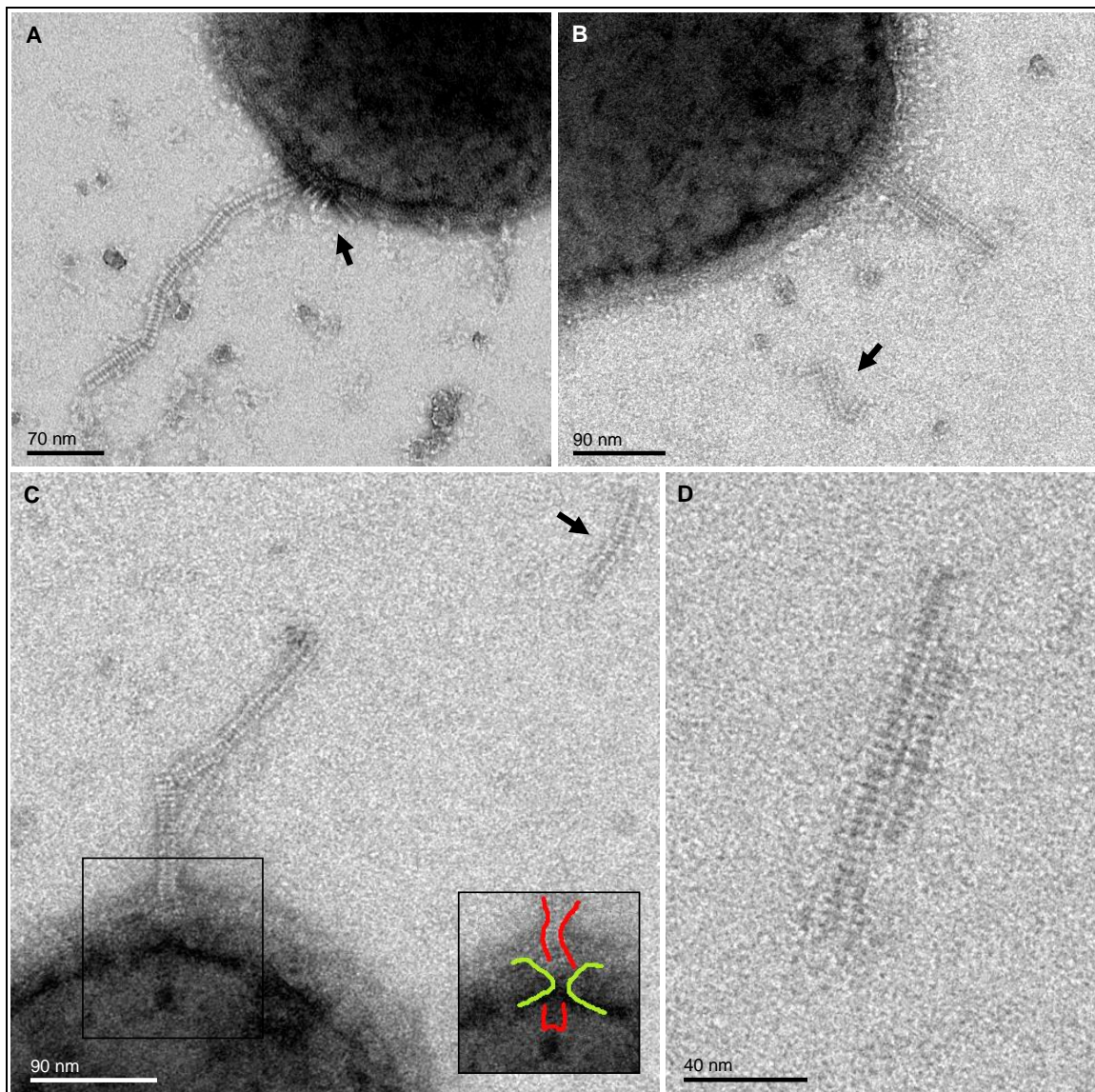


Abb. III.17: TEM-Aufnahme von „leiterähnlichen“ Strukturen an den Zellpolen von *M. thermoautotrophicus* AG5. Bewachsene, kohlebeschichtete Gold-Grids, kontrastiert mit UAc. Die einzigartigen Strukturen haben einen Durchmesser von 13 bis 14 nm und brechen leicht ab, so dass sie auch frei auf dem Kohlefilm vorliegen (Pfeile). Für nähere Erläuterungen siehe Text.

4.3.2 Rasterelektronenmikroskopie

Da TEM-Untersuchungen kein Ergebnis bezüglich der Lokalisation der endständigen, knopfartigen Strukturen an den Fimbrien von *M. thermoautotrophicus* lieferten und stattdessen neue „Ausbuchtungen“ aufzeigten, sollten Analysen im Rasterelektronenmikroskop folgen. Hierzu wurde der Organismus auf verschiedene Oberflächen kultiviert, anschließend fixiert und an Prof. Wanner (Biozentrum der LMU München, Martinsried) übergeben.

Bei den Versuchen die Fimbrien im REM darzustellen zeigte sich, wie von Prof. Wanner mitgeteilt, das Problem, dass die bewachsenen Oberflächen mit einer Art Film überzogen waren. Die aufgelagerte Schicht erschwerte nicht nur die Mikroskopie der 5 nm dünnen Fimbrien sondern machte sie so gut wie unmöglich. Dieses Phänomen trat unabhängig davon auf, ob die Zellen im Medium selbst oder aber in H₂O über die Zugabe von Glutardialdehyd fixiert worden waren. In letzterem Fall waren zwar allgemein weniger Verunreinigungen auf der Aufwuchsoberfläche, allerdings auch weniger Zellen, da diese scheinbar beim Transfer ins Wasser abgelöst wurden.

Ein weiteres Hindernis bei der Betrachtung der Fimbrien stellten unzählige runde Strukturen mit einem Durchmesser von 30-50 nm dar. Diese Strukturen wurden vor allem bei der Verwendung von Pasteurpipettenglas als Aufwuchsmaterial beobachtet und erinnerten an „Kirschkerne“ (persönlicher Kommentar, Prof. Wanner). Die „Kirschkerne“ waren mit einem Netzwerk von Filamenten verbunden, bei denen es sich um Fimbrien gehandelt haben könnte. Da an den Bruchflächen des Glases keine solchen Strukturen vorzufinden waren, war davon auszugehen, dass es sich dabei entweder um Bestandteile aus dem Medium oder aus lysierten Zellen handelte. Lediglich beim Einsatz von Glaskohle als Aufwuchsmaterial waren keine „Kirschkerne“ zu erkennen. Jedoch war auch hier das Präparat, wie oben beschrieben, mit einem Film überzogen, der eine nähere Untersuchung der Fimbrien und deren endständigen Strukturen verhinderte.

4.4 Generierung, Aufreinigung und Analyse von anti-Mth60-Fimbrien Antikörper

Die über PEG-Fällung isolierten und aufgereinigten Fimbrien von *M. thermoautotrophicus* wurden zur Immunisierung eines Kaninchens und eines Huhns eingesetzt. Die Abbildungen zu den nachfolgend genannten Aufreinigungen und Analysen finden sich im Anhang (siehe VI.4, Abb. VI.2 und VI.3).

Zur Auswahl des zu immunisierenden Kaninchens wurden verschiedene Präimmunseren im Western Blot auf bereits bestehende Reaktionen mit den Fimbrien bzw. mit Gesamtzellproteinen aus *M. thermoautotrophicus* hin untersucht. Dabei wurden letztere über mechanischen Zellaufschluss mit dem FastPrep-Homogenisator gewonnen. Während es im Falle der Fimbrien nur vereinzelt zu schwachen Reaktionen kam, reagierten alle zehn getesteten Präimmunseren mit den Gesamtzellproteinen in einem Größenbereich zwischen 40 und

170 kDa. Für die Immunisierung wurde jenes Kaninchen ausgewählt, dessen Serum die schwächste Reaktion hervorrief.

Nach einer Booster-Injektion wurde das Antiserum im Western Blot gegen die Fimbrien eingesetzt und der Titer entsprechend der Detektionsgrenze auf 1:30.000 bestimmt. Die Antikörper vom Typ IgG konnten über eine Protein G Säule an der ÄKTA aufgereinigt werden und wiesen eine Konzentration von 10 mg/ml auf. Der Erfolg dieser Aufreinigung wurde über SDS-Gelelektrophorese bestätigt. Die Antikörper reagierten im Western Blot gegen die Mth60-Fimbrien von *M. thermoautotrophicus* sehr stark bei einer Verdünnung von 1:10.000 und wurden für gewöhnlich in diesem Verhältnis eingesetzt.

Auch für die Immunisierung eines Huhns wurden zunächst Präimmunseren getestet. Die Auswahl des zu immunisierenden Tieres fiel dabei leicht, da keines der Seren mit den Fimbrien bzw. dem Zellaufschluss reagierte. Nach einer Booster-Injektion zeigte die von Davids Biotechnologie erhaltene, wässrige Eidotterlösung im Western Blot eine deutliche Reaktion mit den Fimbrien bis hin zu einer Verdünnung von 1:30.000. Diese Eidotterlösung war bereits einer Lipid-Präzipitation unterzogen worden und zeichnete sich durch die für die IgY-Antikörper typischen prominenten Banden im Bereich von 68 kDa (schwere Ketten) und 22 kDa (leichte Ketten) aus. Als einzige Verunreinigung konnte eine schwache Bande bei etwa 40 kDa ausgemacht werden, bei der es sich vermutlich um Hühnereialbumin handelte. Dieses Protein konnte allerdings auch durch eine weitere Aufreinigung über einen speziellen Kit nicht entfernt werden. Die Konzentration der aufgereinigten Antikörperlösung betrug etwa 10 mg/ml, der Titer wurde im Western Blot jedoch nur auf 1:5.000 bestimmt.

4.5 Immunmarkierungen mit anti-Mth60-Fimbrien Antikörper

Immunmarkierungen an elektronenmikroskopischen Präparaten dienten dazu, sowohl die Verteilung des Hauptfimbriins Mth60 in den Fimbrien, als auch die Lokalisation des Proteins innerhalb der Zellen zu klären. Bei den eingesetzten Antikörpern handelte es sich um jene, die gegen die Fimbrien von *M. thermoautotrophicus* im Kaninchen generiert worden waren. Da die Fimbrien (fast) ausschließlich aus Mth60 bestehen, konnte von einer spezifischen Markierung dieses Proteins ausgegangen werden. Sämtliche Kontrollen, die im Rahmen dieser Immunmarkierungen ohne primären Antikörper durchgeführt wurden, verliefen negativ.

Wie in Abb. III.18 gezeigt, fand eine effiziente und spezifische Markierung der Fimbrien statt. Dabei waren die an den sekundären Antikörper gekoppelten Goldkörner über die gesamte Länge der Fimbrien in gleichem Maße verteilt. Dies war unabhängig davon, ob die Fimbrien im Vorfeld über einen Hitzeschritt denaturiert worden waren (Abb. III.18 A) oder nicht (B).

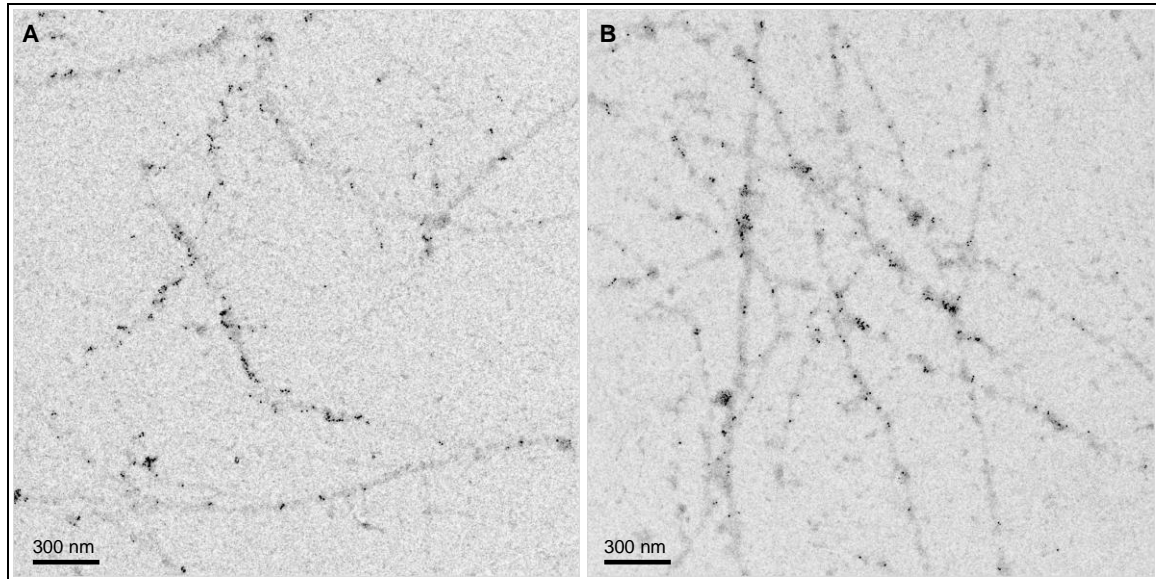


Abb. III.18: Immunmarkierungen an Fimbrien von *M. thermoautotrophicus* DeltaH. TEM-Aufnahmen der markierten Suspensionspräparate, kontrastiert mit UAc. A: mit Hitzefixierung im Vorfeld der Immunmarkierung. B: ohne Hitzefixierung. 1° AK rabbit anti-Mth60-Fimbrien, 1:100; 2° AK goat anti-rabbit + 6 nm Gold, 1:50.

Bei der Immunmarkierung von bewachsenen Gold-Grids fiel zunächst auf, dass sich die Zellen ohne vorherige Hitzefixierung im Laufe der Prozedur von den Grids gelöst hatten. Wurde ein Hitzefixierungsschritt durchgeführt, so waren auf den Grids zahlreiche Zellen vorhanden, allerdings tauchte die bereits unter III.4.3.1 genannte Problematik auf, dass keine zellassoziierten Fimbrien vorlagen. Wie aus Abb. III.19 A hervorgeht, kam es durch die anti-Mth60-Fimbrien Antikörper zu einer starken Markierung der Zelloberfläche von *M. thermoautotrophicus*. Dabei banden die Antikörper nicht ausschließlich, aber verstärkt im Bereich der Zellpole, an denen die Fimbrien ausgebildet werden. Die schwache Kreuzreaktion mit dem Hintergrund ist unter Anbetracht der starken Verunreinigung von bewachsenen Gold-Grids wenig erstaunlich. Des Weiteren muss davon ausgegangen werden, dass sich, wie in III.4.3.1 beobachtet, eine gewisse Anzahl an Fimbrien frei auf dem Kohlefilm befand. An manchen Zellpolen waren kurze, linienförmige Markierungen zu sehen, bei denen es sich vermutlich um abgebrochene Fimbrien handelte (Abb. III.19 B+C, Pfeile). Abb. III.19 D zeigt eine „leiterähnliche“ Struktur (siehe III.4.3.1), die allerdings kaum durch die Fimbrien-spezifischen Antikörper markiert wurde. Dies kann als Hinweis darauf gewertet werden, dass diese Strukturen nicht aus dem Hauptfimbrien Mth60 aufgebaut sind.

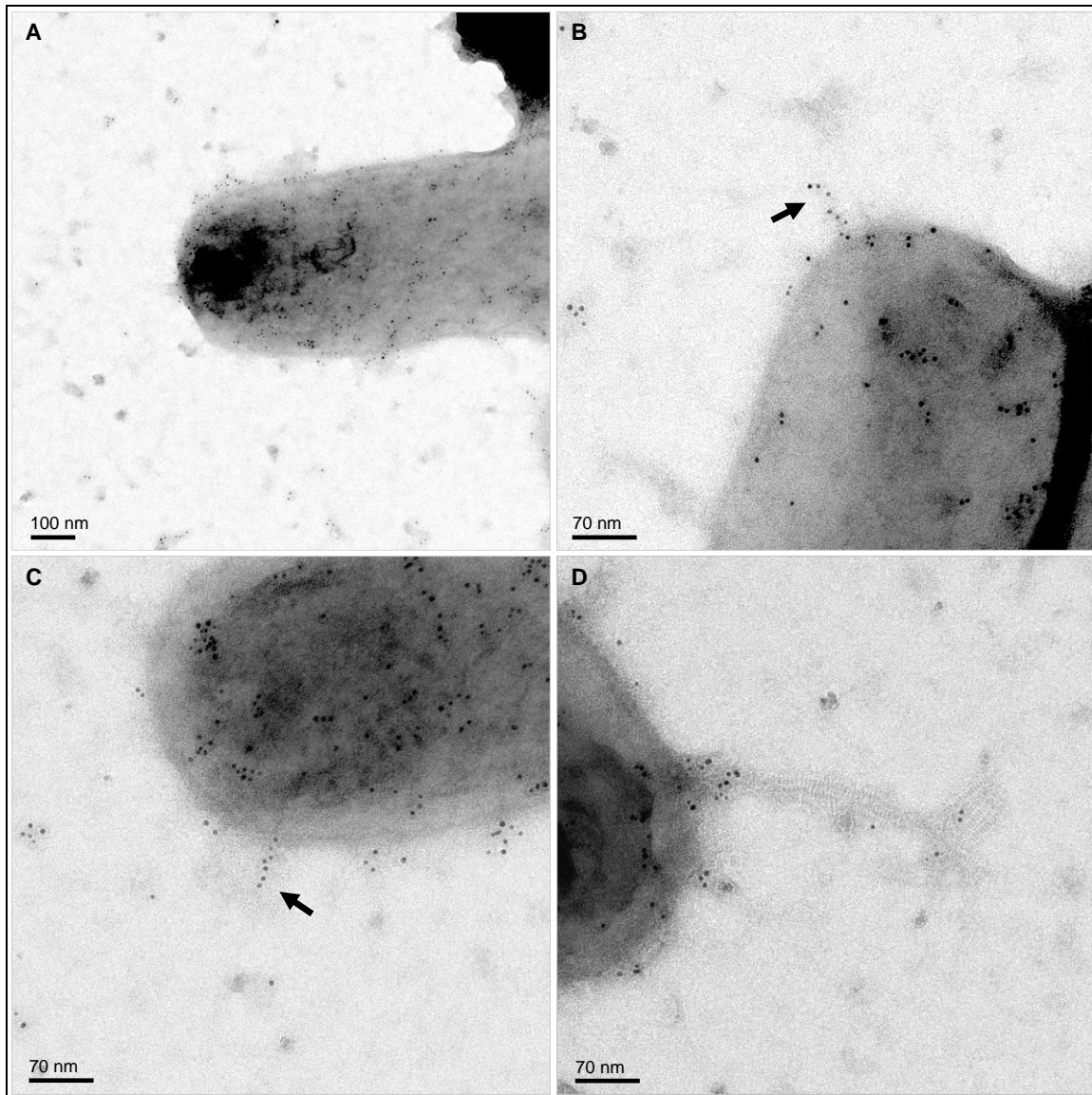


Abb. III.19: Nachweis des Hauptfimbrins Mth60 auf der Zelloberfläche von *M. thermoautotrophicus* DeltaH. TEM-Aufnahmen von Immunmarkierungen an bewachsenen Gold-Grids nach Hitze-fixierung der Präparate. Kontrastierung mit UAc. Die Markierung fand an der gesamten Zelloberfläche statt (A). Pfeile in B+C weisen auf potentielle Fimbrienfragmente hin. Die „leiterähnliche“ Struktur (D) wurde nicht spezifisch markiert. 1° AK rabbit anti-Mth60-Fimbrien, 1:100; 2° AK goat anti-rabbit + 6 nm Gold, 1:50.

Immunmarkierungen an Ultradünnschnitten sollten die subzelluläre Verteilung des Proteins Mth60 in *M. thermoautotrophicus* DeltaH aufzeigen. Zu diesem Zweck wurden einerseits in Cellulosekapillaren kultivierte, andererseits durch Zentrifugation aufkonzentrierte Zellen hochdruckgefroren, gefriersubstituiert, in das Kunstharz Epon eingebettet und in 50 nm dicke Scheiben geschnitten. Wie bereits lichtmikroskopische Untersuchungen im Vorfeld zeigten, konnte der Organismus die Cellulosekapillaren zwar als Aufwuchsoberfläche nutzen, erreichte darin aber keine höhere Zelldichte als im umgebenden Medium. Aus diesem Grund konnten in den entsprechenden Ultradünnschnitten keine Zellen gefunden werden.

Ultradünnschnitte des eingebetteten Zellpellets zeigten eine hohe Anzahl an größtenteils gut erhaltenen Zellen, wenn auch viele von ihnen nur unzureichend von Epon umgeben waren.

Dabei ist denkbar, dass die unvollständige Polymerisierung des Epons von Wechselwirkungen des Harzes mit der dicken Pseudomureinschicht herrührte.

Immunmarkierungen an Ultradünnschnitten wurden stets auf Nickel-Grids durchgeführt, da es bei Verwendung von Kupfer-Grids zu zahlreichen und großflächigen Ablagerungen auf dem Präparat kam. Dies geschah unabhängig davon, ob eine Silberverstärkung oder Kontrastierung mit Uranylacetat stattfand (Daten nicht gezeigt).

Das Ergebnis der Immunmarkierung von *M. thermoautotrophicus*-Ultradünnschnitten mit gegen die Mth60-Fimbrien gerichteten Antikörpern ist in Abb. III.20 dargestellt. Es handelt sich um eine sehr spezifische Markierung mit eindeutigen Signalen am Zellrand, die zum Teil an den Zellpolen verstärkt auftreten. Dies entspricht der erwarteten Lokalisierung von Mth60 im Bereich der Zellwand.

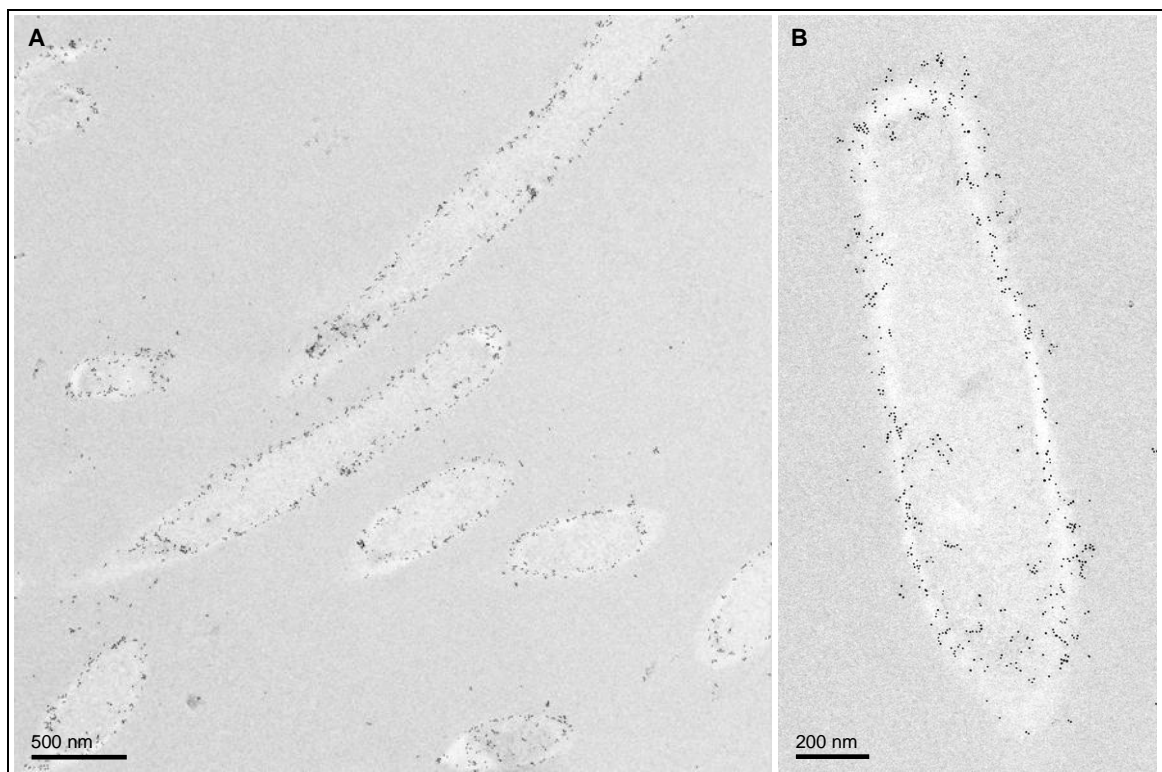


Abb. III.20: Darstellung der subzellulären Lokalisation des Hauptfimbriins Mth60 in *M. thermoautotrophicus* DeltaH. TEM-Aufnahmen nach Immunmarkierung an Ultradünnschnitten. Präparat nicht kontrastiert. 1° AK rabbit anti-Mth60-Fimbrien, 1:100; 2° AK goat anti-rabbit + 6 nm Gold.

5 Untersuchung der Zellanhänge verwandter methanogener Archaeen

Im Rahmen dieser Arbeit sollte überprüft werden, inwiefern die Fimbrien von verwandten methanogenen Archaeen Ähnlichkeiten zu den Fimbrien von *M. thermoautotrophicus* aufwiesen. Die Analysen beschränkten sich auf *Methanothermobacter marburgensis* und *Methanothermobacter fervidus*, da die Gesamtgenomsequenzen dieser beiden Organismen seit Kurzem verfügbar sind (Liesegang *et al.*, 2010; Anderson *et al.*, 2010).

5.1 Isolierung und Analyse der Fimbrien von *M. marburgensis*

Methanothermobacter marburgensis wurde erst im Jahr 2000 als eigene Art deklariert und galt bis dahin als Subspezies von *M. thermoautotrophicus*, so dass ein Vergleich der Fimbrien beider Organismen von besonderem Interesse war. Für die angestrebten Versuche war keine große Fimbrienmenge nötig, weswegen mit lediglich 2,5 l stationär gewachsener *M. marburgensis*-Kultur gearbeitet wurde. Die Gewinnung der Zellanhänge erfolgte basierend auf den Ergebnissen bei der Fimbrienisolierung von *M. thermoautotrophicus* (siehe III.4.1) sowohl über PEG-Fällung des Zentrifugationsüberstandes als auch über das Herauslösen der Zellanhänge aus der Zellwand durch Behandlung des Zellpellets mit PeiP.

5.1.1 Isolierung über PEG-Fällung

Es war davon auszugehen, dass auch im Fall von *M. marburgensis* ein Großteil der Fimbrien durch die bei der Zellernte auf sie wirkenden Scherkräfte abbrechen, so dass die im Kulturüberstand enthaltenen Proteine mit PEG/NaCl gefällt, durch Zentrifugation pelletiert und schließlich über CsCl-Dichtegradientenzentrifugation separiert wurden. Aufgrund der deutlich geringeren PEG-Menge, die sich nach Fällung des 2,5 l Überstandes (im Vergleich zu 100 l bei *M. thermoautotrophicus*) im UZ-Gradientenröhrchen befand, konnten die sechs resultierenden Banden (Fraktionen) besser visualisiert werden und sind in Abb. III.21 A dargestellt. Diese Fraktionen wurden abgenommen und über TEM und SDS-PAGE analysiert. Dabei ließen sich im Elektronenmikroskop vor allem in Fraktion 3 eine Vielzahl an Fimbrien erkennen (Abb. III.21 B+C), deren Durchmesser mit ca. 5 nm dem der Fimbrien von *M. thermoautotrophicus* gleich. Auch hier waren an manchen Fimbrien endständige, knopfartige Strukturen zu finden (Abb. III.21 C, Pfeile), die mit bis zu 40 nm Durchmesser allerdings etwa doppelt so groß waren wie bei *M. thermoautotrophicus*. Im SDS-Gel wurden die Fimbrien als deutliche Bande bei ca. 14 kDa sichtbar (Abb. III.22) und unterschieden sich damit von den Mth60-Fimbrien.

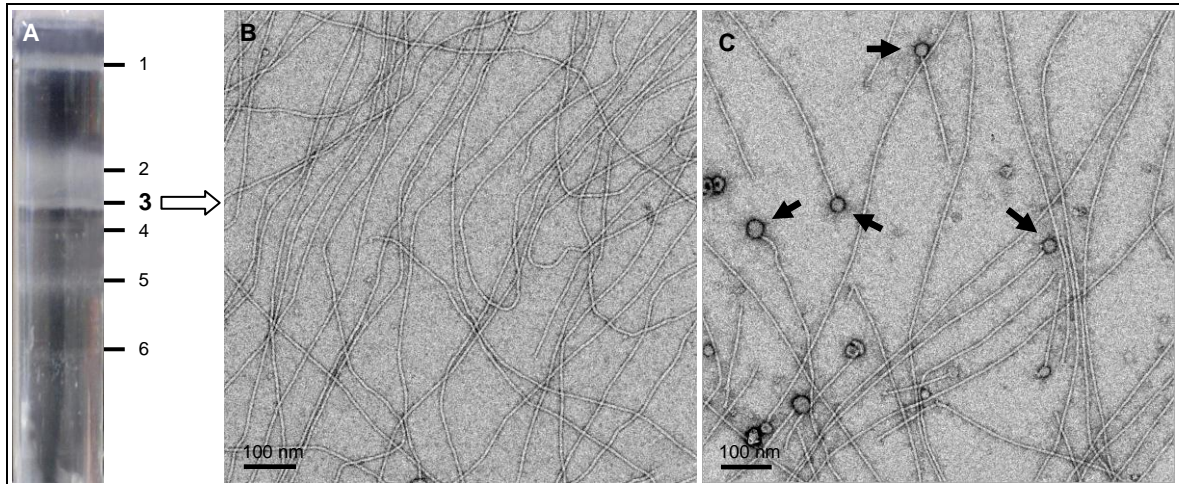


Abb. III.21: Isolierung der Fimbrien von *M. marburgensis* aus dem Zentrifugationsüberstand über PEG-Fällung. A: resultierender CsCl-Gradient mit den Fraktionen 1 bis 6. B+C: TEM-Aufnahmen der Fimbrien aus Fraktion 3. Suspensionspräparate, kontrastiert mit UAc. Pfeile in C deuten auf knopfartige Strukturen.

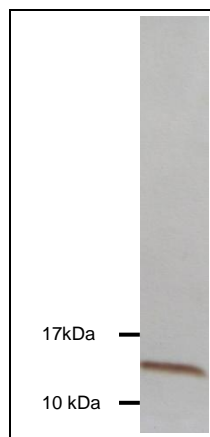


Abb. III.22: Analyse der über PEG-Fällung angereicherten Fimbrien von *M. marburgensis*. SDS-PAGE (12,5 % AA, silbergefärbt) der Fraktion 3 aus Abb. III.21 zeigt Proteine mit einer molekularen Masse von etwa 14 kDa.

5.1.2 Isolierung über Behandlung mit PeiP

Fimbrien bzw. Fimbrienstücke, die nach der Zentrifugation noch zellassoziiert vorlagen, wurden über einen proteolytischen Verdau der Zellwand aus dieser herausgelöst und entsprechend ihrer Dichte von anderen Proteinen und Zellkomponenten getrennt. Dabei entstanden im Ultrazentrifugen-Röhrchen fünf, zum Teil sehr schwache, Banden (Abb. III.23 A), von denen die mittlere (Fraktion 3) Fimbrien enthielt. Der Unterschied zu den über PEG gefällten Fimbrien lag darin, dass zahlreiche „gewundene“ Strukturen auftraten, die an manchen Enden der Fimbrien zu finden waren, so dass es sich dabei vermutlich um Verankerungsstrukturen handelt. Aus Abb. III.23 B geht deutlich hervor, dass diese bis zu 100 nm langen und etwa 40 nm breiten Strukturen fest mit den Fimbrien assoziiert sind und eine Verlängerung dieser darstellen (eindeutige Stellen sind mit Pfeilen markiert).

Knopfartige Strukturen konnten in dieser Fimbrienfraktion nicht beobachtet werden. Im SDS-Gel wurden die Fimbrien, wie oben beschrieben, als Bande auf Höhe von etwa 14 kDa sichtbar (Daten nicht gezeigt). Dies zeigte die Reinheit der Fimbrien auf.

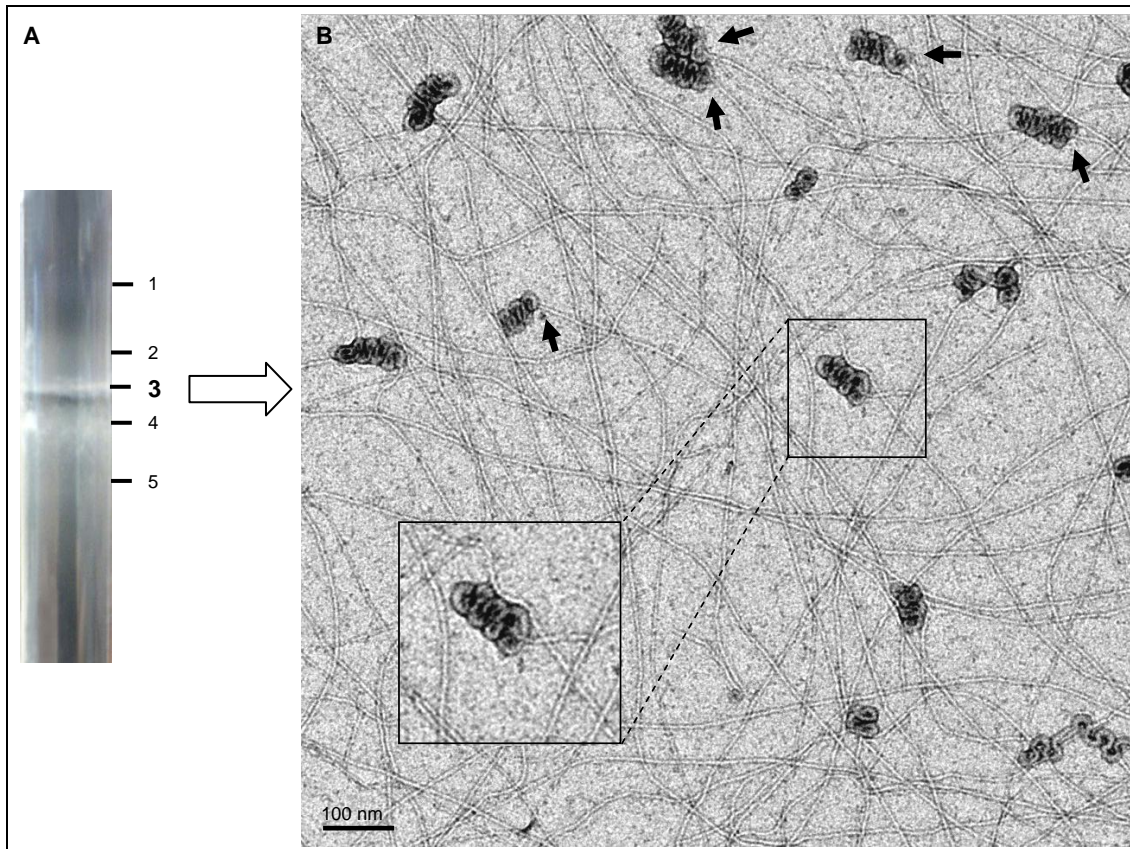


Abb. III.23: Isolierung der Fimbrien von *M. marburgensis* über Behandlung der Zellen mit PeiP. A: resultierender CsCl-Gradient mit den Fraktionen 1 bis 5. B: TEM-Aufnahme der Fimbrien enthaltenden Fraktion 3. Suspensionspräparat, kontrastiert mit UAc. Die Pfeile deuten auf „gewundene“ Strukturen, die sich an den Enden der Fimbrien befinden.

5.2 Isolierung und Analyse der Fimbrien von *M. fervidus*

Methanothermobacter fervidus gehört zur Ordnung der *Methanobacteriales* (Familie *Methanothermobacteraceae*) und steht somit ebenfalls in Verwandtschaft zu *M. thermoautotrophicus*. Der Organismus wurde zwar als flagelliert beschrieben (Jarrell *et al.*, 1996; Kalmokoff *et al.*, 1992), dies konnte jedoch im Labor von Prof. Wirth widerlegt werden (Thoma, 2005; Schmid, 2009). Die Zellanänge weisen einen Durchmesser von 5 nm auf, weswegen von Fimbrien und nicht von den etwa doppelt so dicken Flagellen gesprochen werden muss. Zur näheren Betrachtung dieser Fimbrien wurde auch hier eine Gewinnung über PEG-Fällung und PeiP-Behandlung angestrebt. Aufgrund der bereits vergeblich erfolgten Versuche zur Isolierung dieser Fimbrien (über Ultra-Turrax-Behandlung; Thoma, 2005; Schmid, 2009) wurde ein größerer Versuchsansatz in Form von 4 l stationär gewachsener Kultur gewählt.

5.2.1 Isolierung über PEG-Fällung

Bei dem Versuch zur Anreicherung der Fimbrien aus dem Zentrifugationsüberstand über PEG-Fällung konnten im isopyknischen Dichtegradienten drei Banden detektiert werden. Diese waren allerdings nur sehr schwer erkennbar, da der gesamte Gradient aufgrund des PEG stark getrübt erschien (Daten nicht gezeigt). Die elektronenmikroskopische Untersuchung der drei Fraktionen zeigte, dass die Fimbrien in der obersten, sehr schmalen Bande enthalten waren. An den 5 nm dünnen, langen und gut strukturierten Fimbrien wurden keinerlei endständige Strukturen beobachtet (Abb. III.24). Aufgrund der sehr geringen Fimbrienmenge war es nicht möglich, die Proteine über SDS-PAGE nachzuweisen, so dass keine Aussage über die molekulare Masse des Fimbrins bzw. der Fimbrine getroffen werden kann. Die mittlere Bande des CsCl-Gradienten, die entsprechend elektronenmikroskopischer Beobachtungen hauptsächlich Zellen und nur vereinzelt Fimbrien enthielt, zeichnete sich im silbergefärbten SDS-Gel durch Proteinbanden vor allem im Bereich von etwa 17 bis 20 kDa aus (Daten nicht gezeigt). Aufgrund der geringen Fimbrienmenge im TEM erscheint es allerdings als unwahrscheinlich, dass es sich dabei um Fimbrienproteine handelte.

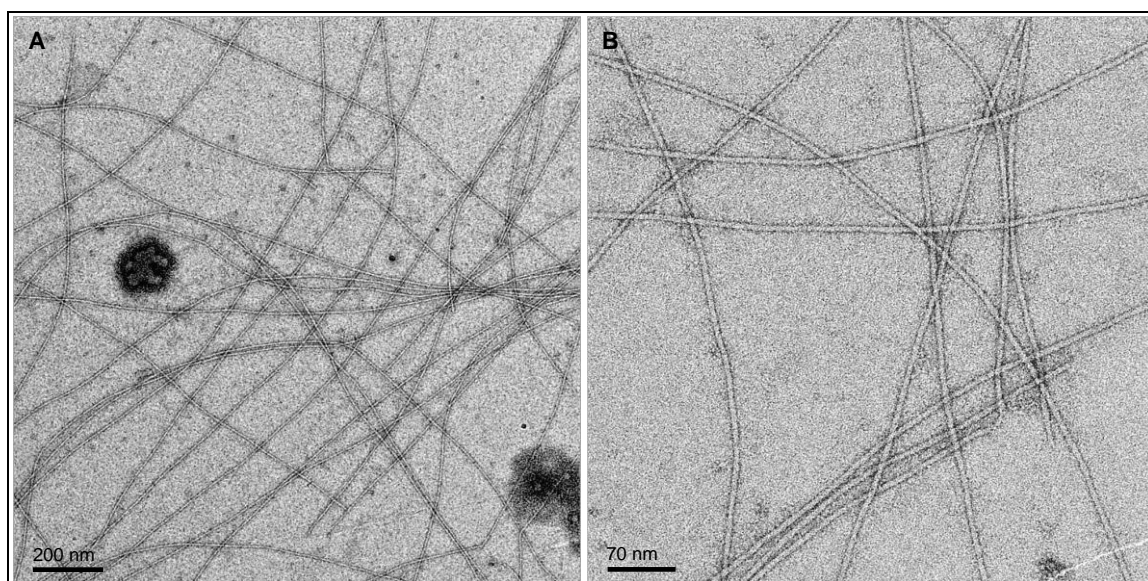


Abb. III.24: Fimbrien von *M. fervidus* nach Isolierung aus dem Kulturüberstand über PEG-Fällung. TEM-Aufnahmen von Suspensionspräparaten, kontrastiert mit UAc.

5.2.2 Isolierung über Behandlung mit PeiP

Nach Behandlung der geernteten Zellen mit PeiP und Dichtegradientenzentrifugation waren im Ultrazentrifugenröhrchen ebenfalls drei Banden entstanden (Abb. III.25 A). Über SDS-PAGE konnten in keiner dieser Fraktionen Proteine nachgewiesen werden. TEM-Untersuchungen zeigten zwar, dass die Fimbrien in Fraktion 1 enthalten waren, allerdings war ihre Menge, anders als Abb. III.25 B vermuten lässt, insgesamt recht gering.

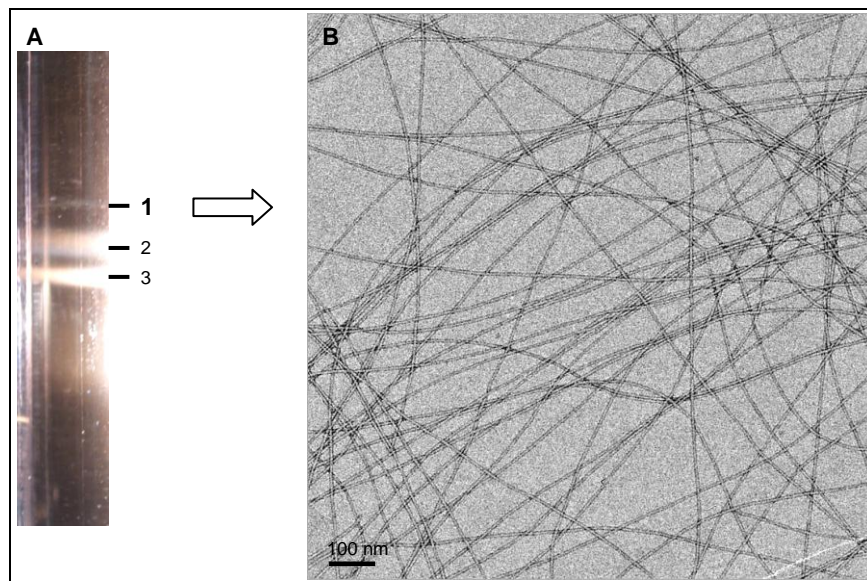


Abb. III.25: Isolierung der Fimbrien von *M. fervidus* durch Behandlung der Zellen mit PeiP. A: resultierender CsCl-Gradient mit den Fraktionen 1 bis 3. B: TEM-Aufnahme der Fimbrien aus Fraktion 1. Suspensionspräparat, kontrastiert mit UAc.

5.3 Versuche zur Identifizierung der Fimbrine

Von besonders großem Interesse war es herauszufinden, inwiefern die (Haupt-)Proteine der Fimbrien von *M. marburgensis* und *M. fervidus* Ähnlichkeiten zu Mth60 aufweisen. Es wurden zahlreiche Versuche zur Identifizierung der Fimbrine über Massenspektrometrie unternommen, die ähnlich erfolglos verliefen wie bei *M. thermoautotrophicus* (siehe III.4.2). Dabei wurde im Fall von *M. marburgensis* die 14 kDa-Proteinbande (siehe III.5.1.1) mit Trypsin bzw. Chymotrypsin versetzt und die extrahierten Peptide über MALDI-TOF MS/MS analysiert. In beiden Fällen konnten zwar die korrekten Versuchsbedingungen anhand der eingesetzten Enzyme, die sich im Laufe der Inkubationszeit selbst verdaut hatten, nachvollzogen werden, allerdings misslang eine Detektion weiterer Peptide. Für *M. fervidus* konnte aufgrund der geringen Fimbrienmenge kein in-Gel-Verdau erfolgen. Stattdessen wurde die Fimbrien enthaltende Lösung (nach Inkubation bei 100°C und kurzer Abkühlphase) direkt mit den Peptidasen versetzt und die Proben anschließend über LC/MS untersucht. Auch dies lieferte kein Ergebnis, so dass keinerlei Aussage über die Identität der Fimbrine von *M. fervidus* und *M. marburgensis* möglich ist.

Wie bereits unter III.2 beschrieben, konnten bei bioinformatischen Analysen für Mth60 keine Homologien zu Proteinen mit bekannten Funktionen ausgemacht werden. Die gezielte Datenbankrecherche gegen das kürzlich veröffentlichte Genom von *M. fervidus* konnte auch keinerlei signifikante Ähnlichkeiten zu hypothetischen Proteinen aufdecken, weswegen von einem nicht mit Mth60 verwandten Fimbrin auszugehen ist. Die Blast-Suche im Fall von *M. marburgensis* lieferte zwar Sequenzähnlichkeiten von Mth60 zu den hypothetischen Proteinen Mtbma_c07830 (e-value: 1×10^{-7} , Score 45,4) und Mtbma_c07820 (e-value 9×10^{-7} , Score 42,7), allerdings wiesen diese bei genauerer Analyse deutlich signifikantere Ähnlich-

keiten zu den Proteinen Mth383 und Mth382 aus *M. thermoautotrophicus* auf. Hierbei lagen die e-values zwischen 6×10^{-81} und 4×10^{-96} und die Score-Werte in der Größenordnung von 250. Die Daten hierzu finden sich auf der Begleit-CD (siehe VI.5).

5.4 Überprüfung auf Kreuzreaktionen mit anti-Mth60-Fimbrien Antikörper

Obwohl die Ergebnisse aus III.5.3 darauf schließen lassen, dass die Fimbrien von *M. marburgensis* und *M. fervidus* kaum bzw. keine Ähnlichkeiten zu denen von *M. thermoautotrophicus* aufweisen, wurden Tests auf Kreuzreaktionen durchgeführt. Diese fanden zunächst über Western Blot statt und zeigten, dass die Fimbrien von *M. marburgensis* keine Bindung der anti-Mth60-Fimbrien Antikörper hervorzurufen vermögen (Abb. III.26 A, Spur 2). Vor allem aufgrund der deutlichen Reaktion der Positivkontrolle, also den Fimbrien von *M. thermoautotrophicus* (Abb. III.26 C, Spur 2) und dem Vergleich der eingesetzten Proteinmengen im SDS-Gel (jeweils Spur 1) wird deutlich, dass keinerlei Kreuzreaktion stattfindet.

Im Fall der aufgereinigten Fimbrien von *M. fervidus* konnten weder im SDS-Gel Proteine sichtbar gemacht (siehe III.5.2), noch im Western Blot über die anti-Mth60-Fimbrien Antikörper detektiert werden (Daten nicht gezeigt). Bei Einsatz der Fraktion aus dem Dichtegradienten, die in erster Linie Zellen und nur vereinzelt Fimbrien enthielt (siehe III.5.2.1) konnte eine schwache Reaktion im Western Blot detektiert werden (Abb. III.26 B, Spur 2). Diese ist jedoch in Anbetracht der auf das SDS-Gel aufgetragenen Proteinmengen (Spur 1) als sehr gering und eher unspezifisch einzustufen.

Auch Immunmarkierungen an Suspensionspräparaten der Fimbrien von *M. marburgensis* und *M. fervidus* ließen im Elektronenmikroskop keine spezifische Antikörperbindung erkennen (Daten nicht gezeigt).

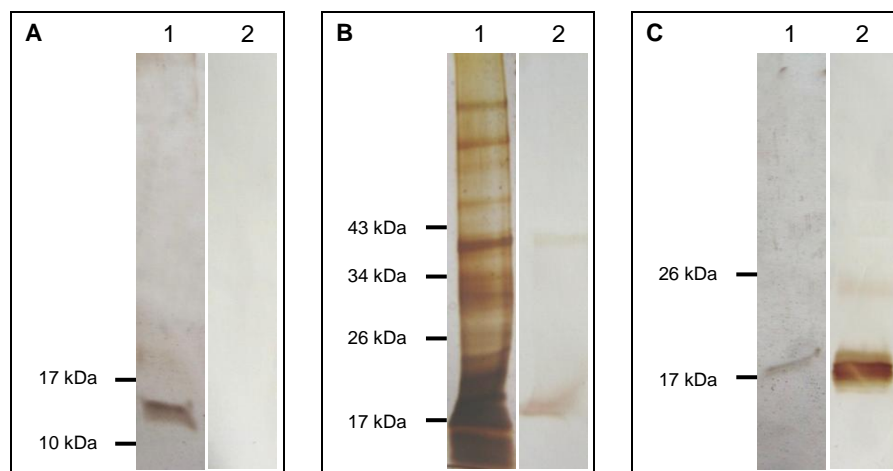


Abb. III.26: Überprüfung der Fimbrien bzw. der Fimbrien enthaltenden Proben von *M. marburgensis* und *M. fervidus* auf Kreuzreaktionen mit Antikörper gegen die Mth60-Fimbrien von *M. thermoautotrophicus*. A: *M. marburgensis*. B: *M. fervidus*. C: *M. thermoautotrophicus*. Gezeigt sind jeweils die SDS-Gele (12,5 % AA, silbergefärbt) zur Darstellung der eingesetzten Proteinmengen (1) sowie die zugehörigen Western Blots (2). 1° AK rabbit anti-Mth60-Fimbrien, 1:5.000; 2° AK goat anti-rabbit, 1:2.000.

6 Studien zur Funktion und Lokalisation von Mth59

Wie aus bioinformatischen Analysen hervorgeht (siehe III.2), weist das Protein Mth59 starke Ähnlichkeiten zu Chaperonen aus Gram-negativen Bakterien auf, die an der Assemblierung von Zellanhängen beteiligt sind. Um den Chaperon-Charakter experimentell zu untersuchen, wurden Versuche zur Klärung der Funktion sowie Aufdeckung der Lokalisation dieses Proteins angestrebt.

6.1 Überprüfung der Funktion von Mth59

6.1.1 Co-Immunpräzipitationen

Co-Immunpräzipitationen (Co-IP) sollten in dieser Arbeit Hinweise auf die Funktion von Mth59 liefern und gegebenenfalls die Identifizierung weiterer Proteine, die am Aufbau der Fimbrien beteiligt sind, ermöglichen. Zu diesem Zweck wurden Säulen, die mit immobilisierten Antikörpern versehen waren, mit Proteinlösungen beladen. Bei den Proteinlösungen handelte es sich einerseits um ein Zelllysats von *M. thermoautotrophicus* und andererseits um die rekombinanten Proteine Mth59 und Mth60, wobei letztere im Vorfeld miteinander gemischt und über Nacht inkubiert worden waren. Lag Mth59 mit anderen Proteinen (bzw. speziell mit Mth60) assoziiert vor, so konnte davon ausgegangen werden, dass es zu einer Co-Elution der gebundenen Proteine kommt. Die Immunpräzipitationen erfolgten über Antikörper, die entweder gegen Mth59 oder gegen die Fimbrien von *M. thermoautotrophicus* – und damit in erster Linie gegen das dominierende Fimbrin Mth60 – gerichtet waren (in Folge als anti-„Mth60“ Antikörper benannt).

Co-IP mit Proteinlösung von *M. thermoautotrophicus*

Zur Gewinnung von Gesamtzellproteinen wurden zwei Varianten des Zellaufschlusses untersucht: Ein enzymatischer Aufschluss mit der Pseudomurein-Endoisopeptidase PeiP und ein mechanischer Aufschluss über den FastPrep-Homogenisator. In beiden Fällen wurde mit *M. thermoautotrophicus* AG5 gearbeitet, der eine höhere Anzahl an Fimbrien ausbildet, weswegen auch von einer größeren intrazellulären Menge der am Aufbau der Fimbrien beteiligten Proteine ausgegangen werden konnte.

Nach Entfernung der größeren Zellkomponenten über Zentrifugation wurden die Überstände über SDS-PAGE analysiert. Dabei konnte im Fall des mechanischen Zellaufschlusses eine deutlich höhere Proteinmenge detektiert werden als im PeiP-Ansatz. Western Blots mit anti-„Mth60“ Antikörper zeigten in beiden Fällen eindeutig, dass das Hauptfimbrin Mth60 enthalten war (Daten nicht gezeigt). Die elektronenmikroskopische Untersuchung der PeiP-Proteinlösung machte allerdings deutlich, dass diese hauptsächlich Fimbrien enthielt, die durch das Enzym aus der Zellwand herausgelöst worden waren. Basierend auf diesem Ergebnis wurde künftig eine PeiP-Behandlung der Zellen zur gezielten Isolierung von Fimbrien eingesetzt (siehe III.4.1.3). Da über die Pseudomuramidase keine oder kaum intrazelluläre Proteine isoliert werden konnten, diente die über mechanischen Zellaufschluss erhaltene Gesamtzell-

proteinlösung als Material für die Immunpräzipitationen. Diese Lösung enthielt entsprechend elektronenmikroskopischer Kontrollen keine nennenswerte Anzahl an Fimbrien und wurde im Western Blot dennoch positiv auf das dominierende Fimbrienprotein Mth60 getestet (Daten nicht gezeigt). Der Nachweis des vermeintlichen Chaperons Mth59 gelang nicht, allerdings gestaltete sich dies aufgrund eines erschwerten Transfers auf die Blotmembran allgemein schwierig (siehe III.3.3).

Insgesamt wurde 1 mg der Proteinlösung in eine (Co-)Immunpräzipitation eingesetzt. Die Verwendung von Antikörpern, die gegen Mth59 gerichtet waren, führte im silbergefärbten SDS-Gel zu keinerlei Signalen, so dass auch keine Interaktionspartner bestimmt werden konnten. Erfolgte die Co-IP über immobilisierte Antikörper gegen die Mth60-Fimbrien, so enthielt die Elutionsfraktion lediglich eine Bande auf Höhe von Mth60. Demnach war es zu keiner, jedenfalls zu keiner detektierbaren, Co-Elution von Mth59 gekommen (Daten nicht gezeigt).

Co-IP mit rekombinanten Proteinen

Mithilfe von rekombinant hergestellten Proteinen sollte eine mögliche Wechselwirkung zwischen dem Hauptfimbrin Mth60 und dem putativen Chaperon Mth59 untersucht werden. Zu diesem Zweck wurden die unter denaturierenden Bedingungen isolierten Proteine sofort nach der Aufreinigung dialysiert, um eine gewisse Renaturierung zu ermöglichen. Mth60 und Mth59 wurden im Mengenverhältnis 1:1 gemischt und über Nacht sanft schüttelnd bei Raumtemperatur inkubiert.

Dabei handelte es sich bei Mth60 um das Protein, das durch Expression des Konstruktes I erhalten und über den C-terminalen His-Tag aufgereinigt worden war (siehe III.3.2). Das rekombinante Mth59 war mit einem N-terminalen His-Tag fusioniert, der durch proteolytischen Verdau mit Thrombin entfernt werden konnte. Um einen störenden Einfluss des His-Tags auszuschließen, wurden parallel Versuche angesetzt, bei denen dieser im Vorfeld abgespalten worden war. Da bei keinem der durchgeführten Versuche ein Unterschied bezüglich des His-Tags zu verzeichnen war und die Ergebnisse stets identisch waren, wird in Folge nicht gesondert darauf eingegangen.

Abb. III.27 zeigt das Ergebnis einer Co-IP, bei der die Säulenmatrix mit anti-Mth59 Antikörper versehen und mit einer Proteinlösung aus rekombinanten Proteinen beladen wurde. Nachdem im letzten Waschschrift keinerlei Proteine im silbergefärbten SDS-Gel detektierbar waren (Abb. III.27 A, Spur 1), enthielt die erste Elutionsfraktion (A, Spur 2) Proteine, die genau der molekularen Masse der eingesetzten Proteine Mth59 und Mth60 (A, Spuren 3+4) entsprachen. Die Anwesenheit zweier Banden sowohl im Fall von Mth60 als auch Mth59 ist unter III.3.2 und III.3.3 erklärt. Die Mengen der eluierten Proteine entsprechen in etwa dem eingesetzten Verhältnis von 1:1, weswegen von einer ebensolchen Interaktion auszugehen ist. Nicht gezeigt sind in Abb. III.27 A die Fraktionen des Durchlaufs sowie des ersten

Waschschrilles, die allerdings beide nur sehr schwache, sich an der Detektionsgrenze befindende Proteinbanden auf Höhe von Mth60 aufwiesen.

Western Blots bestätigten, dass es sich bei den eluierten Proteinen sowohl um Mth60 (Abb. III.27 B), als auch um Mth59 (Abb. III.27 C) handelte. Dabei ist die schwache Detektion von Mth59 im Western Blot ist auf eine schlechte Übertragung dieses Proteins vom SDS-Gel auf die PVDF-Membran zurückzuführen (siehe III.3.3). Mehrfache Wiederholungen dieses Versuchs lieferten identische Resultate.

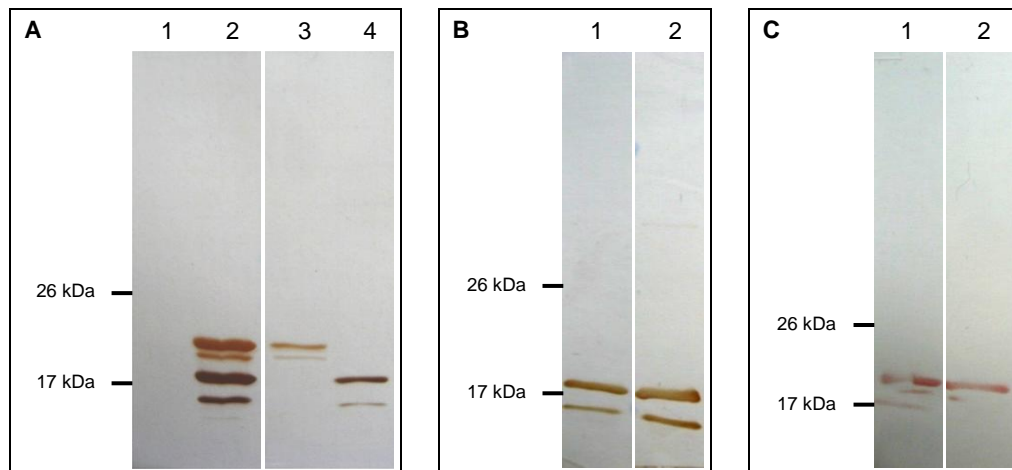


Abb. III.27: Co-Immunpräzipitation der rekombinanten Proteine Mth59 und Mth60 unter Verwendung von anti-Mth59 Antikörper. A: SDS-PAGE (12,5 % AA, silbergefärbt) der letzten Waschfraktion (1), ersten Elutionsfraktion (2) sowie der eingesetzten Proteine Mth59 (3) und Mth60 (4). B: Western Blot zum Nachweis von Mth60 im Eluat (1), vergleichend dazu Mth60 (2). 1° AK rabbit anti-„Mth60“, 1:5.000; 2° AK goat anti-rabbit, 1:2.000. C: Western Blot zum Nachweis von Mth59 im Eluat (1), vergleichend dazu Mth59 (2). 1° AK rabbit anti-Mth59, 1:5.000; 2° AK goat anti-rabbit, 1:2.000.

Der parallel durchgeführten Versuch mit einer Kit-internen Negativkontrolle, bei der die Antikörper nicht an das Säulenmaterial zu binden vermochten, zeigte, dass im SDS-Gel keinerlei Proteine in den Elutionsfraktionen vorhanden waren. Vielmehr waren die eingesetzten Proteine im Durchlauf und in der ersten Waschfraktion enthalten (Daten nicht gezeigt), weswegen von keiner unspezifischen Bindung der Proteine an die Agarose-Beads bzw. an die Wandungen des Säulchens auszugehen war.

Ebenfalls negativ verlief eine Kontrolle, in der ausschließlich Mth60 eingesetzt wurde (siehe Abb. III.28), so dass auch die ohnehin unwahrscheinliche Bindung dieses Proteins an die anti-Mth59 Antikörper ausgeschlossen werden konnte. Diese Ergebnisse sprechen für eine Interaktion zwischen dem putativen Chaperon Mth59 und dem Hauptfimbrin Mth60.

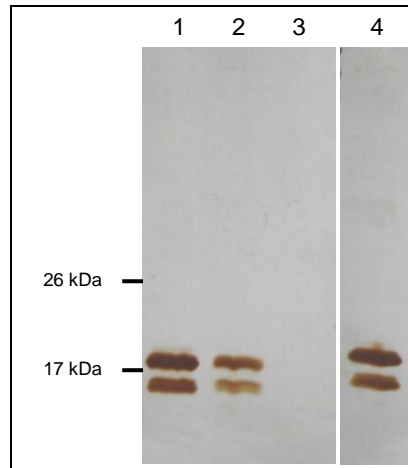


Abb. III.28: Versuch zur Immunpräzipitation von Mth60 unter Verwendung von anti-Mth59 Antikörper. SDS-PAGE (12,5 % AA, silbergefärbt) des Durchlaufs (1), der ersten Waschfraktion (2) und der Elutionsfraktion (3); vergleichend dazu das in den Versuch eingesetzte Mth60 (4).

Zur weiteren Überprüfung der erhaltenen Ergebnisse wurde der Versuchsansatz mit den rekombinanten Proteinen Mth60 und Mth59 auch unter Verwendung der anti-„Mth60“ Antikörper durchgeführt. Hierbei wurden absolut identische Ergebnisse erzielt wie im Fall der anti-Mth59 Antikörper: Die erste Elutionsfraktion zeigte im silbergefärbten SDS-Gel eine eindeutige Co-Elution von Mth60 und Mth59 (Abb. III.29 A). Western Blots mit den jeweiligen Antikörpern bestätigten, dass es sich dabei um die entsprechenden Proteine handelte (Abb. III.29 B+C).

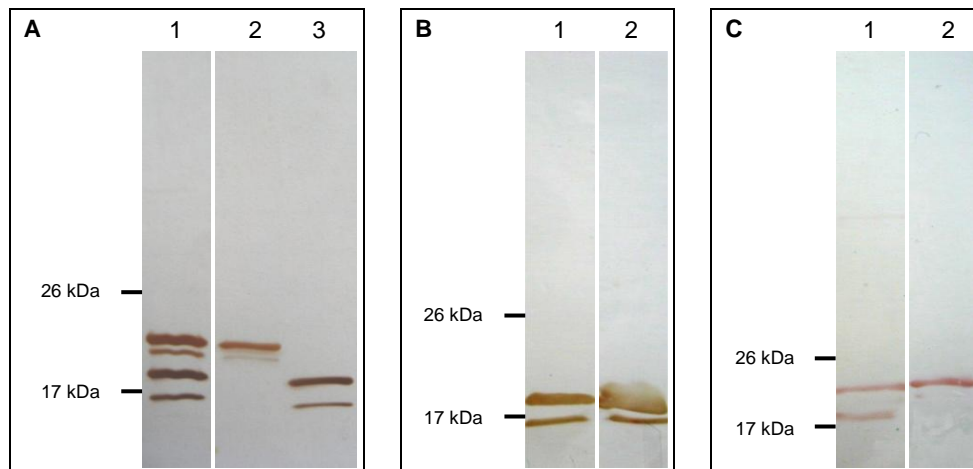


Abb. III.29: Co-Immunpräzipitation der rekombinanten Proteine Mth59 und Mth60 unter Verwendung von anti-„Mth60“ Antikörper. A: SDS-PAGE (12,5 % AA, silbergefärbt) der ersten Elutionsfraktion (1), vergleichend dazu die eingesetzten Proteine Mth59 (2) und Mth60 (3). B: Western Blot zum Nachweis von Mth60 im Eluat (1), vergleichend dazu Mth60 (2). 1° AK rabbit anti-„Mth60“, 1:5.000; 2° AK goat anti-rabbit, 1:2.000. C: Western Blot zum Nachweis von Mth59 im Eluat (1), vergleichend dazu Mth59 (2). 1° AK rabbit anti-Mth59, 1:5.000; 2° AK goat anti-rabbit, 1:2.000.

Um eine unspezifische Bindung von Mth60 durch Mth59 auszuschließen, wurden als weitere Kontrollen Lysozym bzw. Rinderserumalbumin (BSA) anstelle von Mth60 eingesetzt. Die Proteine wurden hierzu jeweils im Verhältnis 1:1 mit Mth59 gemischt und ebenfalls über Nacht inkubiert. Bei den für die Immunpräzipitation verwendeten Antikörpern handelte es sich jene, die gegen Mth59 gerichtet waren.

Lysozym wurde aufgrund seiner mit Mth60 vergleichbaren molekularen Masse ausgewählt. Wie aus Abb. III.30 A hervorgeht, kam es zu keiner nennenswerten Co-Elution des 14 kDa-

Proteins. Bei den von der Säule eluierten Proteinen (Spur 4) handelte es sich hauptsächlich um Mth59 (Spur 5) und lediglich geringe Spuren Lysozym (Spur 6). Letzteres fand sich hingegen hauptsächlich im Durchlauf und dem ersten Waschschriff (Spuren 1+2). Auch Wiederholungen dieses Versuchs ergaben, dass es zu keiner Interaktion zwischen Mth59 und Lysozym gekommen war (Abb. III.30 B).

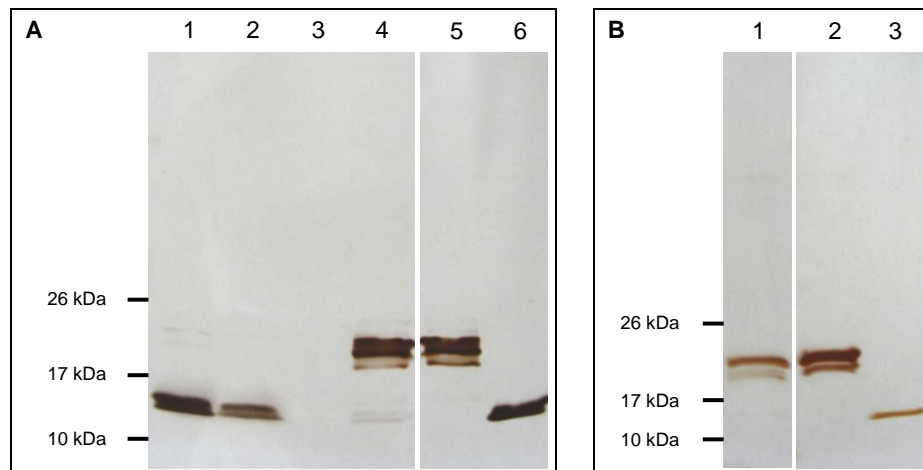


Abb. III.30: Versuche zur Co-Immunpräzipitation von Mth59 und Lysozym über immobilisierte anti-Mth59 Antikörper. SDS-PAGEs (12,5 % AA, silbergefärbt) zweier Co-IPs. A: erstes Experiment; Durchlauf (1), erste Waschkfraktion (2), letzte Waschkfraktion (3), erste Elutionsfraktion (4); vergleichend dazu die eingesetzten Proteine Mth59 (5) und Lysozym (6). B: zweites Experiment; Spuren 1-3 entsprechen 4-6 aus A.

Die Immunpräzipitationen zur Überprüfung einer möglichen Bindung des BSA durch Mth59, lieferten keine so eindeutigen Ergebnisse. In einem ersten Experiment konnte gezeigt werden, dass es zu keiner Interaktion der Proteine kommt, da ausschließlich Mth59 von der Säule eluiert wurde (Abb. III.31 A, Spur 4). Vergleiche mit den eingesetzten Proteinen (Spuren 5+6) machten deutlich, dass sich das 66 kDa-Protein BSA ausschließlich in den Fraktionen des Durchlaufs sowie des ersten Waschschriffes (Spuren 1+2) befand.

Zweimalige Wiederholungen dieses Versuchsansatzes lieferten trotz identischer Durchführung leicht abweichende Ergebnisse. Wie aus Abb. III.31 B hervorgeht, kam es zu einer gewissen Co-Elution von BSA (Spur 4). Dabei betrug das Verhältnis der beiden Proteine zueinander nicht 1:1 sondern fiel zugunsten von Mth59 aus. Auffällig war, dass sich der Großteil des BSA im Durchlauf (Spur 1) und auch im ersten Waschschriff (Spur 2) befand. Bei der Interpretation dieser Ergebnisse müssen auch die auf das SDS-Gel aufgetragenen Proteinmengen bedacht werden: Zur Visualisierung der im Durchlauf enthaltenen Proteine wurden 15 µl (von insgesamt 600 µl) eingesetzt, im Fall des ersten Waschschriffes ebenfalls 15 µl (von 200 µl) und bei der Elutionsfraktion 20 µl (von 75 µl). Damit war im Durchlauf – zusätzlich zu dem auf dem Gel sichtbaren Unterschied – eine um etwa achtfach höhere BSA-Menge enthalten verglichen mit der Elutionsfraktion. Damit kann also von einer relativ schwachen Interaktion zwischen Mth59 und BSA gesprochen werden.

Eine Negativkontrolle mit der Kit-internen modifizierten Agarose und einem Mth59/BSA-Proteingemisch ließ keinerlei Proteine im Eluat erkennen (Daten nicht gezeigt), so dass eine

unspezifische Bindung des BSA an das Säulenmaterial bzw. die Wandungen der Säule ausgeschlossen werden kann. Demzufolge stammte das co-eluierte BSA aus einer schwachen Interaktion mit Mth59.

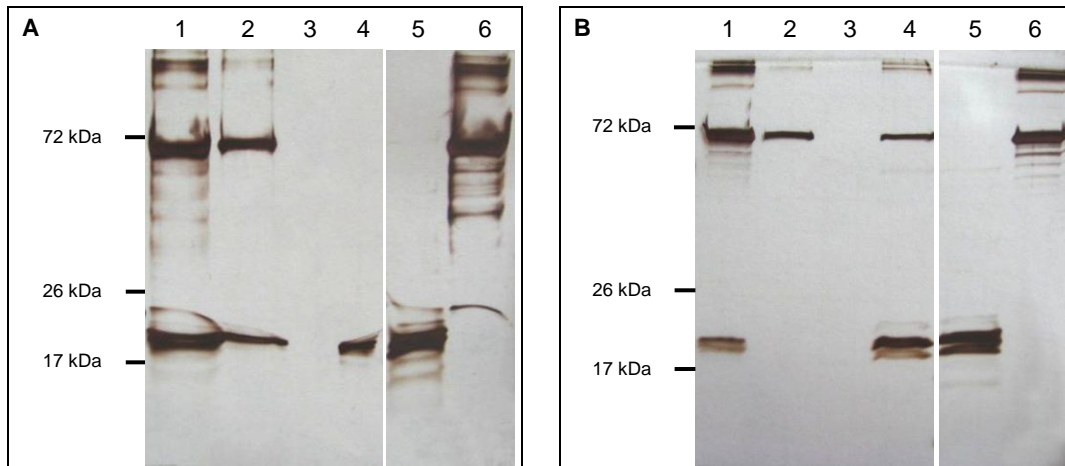


Abb. III.31: Versuche zur Co-Immunpräzipitation von Mth59 und BSA über immobilisierte anti-Mth59 Antikörper. SDS-PAGEs (12,5 % AA, silbergefärbt) zweier Co-IPs. A: erstes Experiment; Durchlauf (1), erste Waschfraktion (2), letzte Waschfraktion (3), erste Elutionsfraktion (4); vergleichend dazu die eingesetzten Proteine Mth59 (5) und BSA (6). B: zweites Experiment; Spuren 1-6 entsprechen denen aus A.

6.1.2 Gelfiltrations-Chromatographie

Gelfiltrations-Chromatographie sollte herangezogen werden um die Interaktion zwischen Mth59 und Mth60 zu bestätigen und damit den Chaperon-Charakter von Mth59 weiter zu bestärken. Da das Trennungsprinzip dieser Methode auf der unterschiedlichen Größe von Molekülen beruht, die die poröse Matrix verschieden schnell passieren, war davon auszugehen, dass Mth59 und Mth60 im Falle einer Bindung aneinander schneller eluieren als die einzelnen Proteine. Bei der hierbei verwendeten Säule handelte es sich um eine Superdex 75 10/300 GL (24 ml Volumen), die die optimale Auftrennung von Proteinen mit einer molekularen Masse zwischen 3 und 70 kDa gewährleistet.

Zunächst sollten die Proteine einzeln auf die Säule geladen und die Elutionszeitpunkte dokumentiert werden. Jedoch scheiterte dies bereits für das mit 1,2 mg/ml höher konzentrierte Mth59, da über den UV_{280} -Wert kein Peak im Chromatogramm ausgemacht werden konnte. Demnach reichte die auf die Säule aufgebrachte Proteinmenge von ca. 300 μ g wider Erwarten nicht für eine Detektion aus. Laut Herstellerangaben führen aber im Fall von Vitamin B12 selbst 50 μ g zu einem deutlichen Anstieg der UV-Absorption von etwa 25 mAU (*milli absorbance units*).

Da es nicht möglich war, höher konzentrierte rekombinante Proteine zu isolieren und das auf die Säule geladene Probenvolumen mit 250 μ l der obersten Grenze der Herstellerangaben entsprach, wurde dieses Experiment nicht weiter verfolgt.

6.2 Überprüfung der Lokalisation von Mth59

6.2.1 Immunmarkierungen an elektronenmikroskopischen Präparaten

Um einen Hinweis auf die (zelluläre) Lokalisation des putativen Chaperons Mth59 zu erhalten, wurden Immunmarkierungen an aufgereinigten Fimbrien, bewachsenen Gold-Grids sowie Ultradünnschnitten von *M. thermoautotrophicus* DeltaH durchgeführt. Als Positivkontrollen dienten stets Markierungen mit Antikörpern gegen die Mth60-Fimbrien (siehe III.4.5). Trotz zahlreicher Wiederholungen und Variationen in den Versuchsdurchführungen konnten in keinem der Fälle spezifische Markierungen der Präparate verzeichnet werden. So wurde der primäre anti-Mth59 Antikörper in Verdünnungen zwischen 1:100 und 1:25 eingesetzt. Als sekundäre Antikörper dienten zum einen jene, die mit 6 nm Gold (Verdünnungen 1:50 und 1:25) und zum anderen mit ultra-small Gold (Verdünnung 1:50) gekoppelt waren. Letztere sollten aufgrund der geringen Größe der Goldpartikel (0,8 nm) und der damit einhergehenden, herabgesetzten sterischen Hinderung bessere Markierungsergebnisse liefern. Ferner wurde versucht, vor der Markierung zusätzliche Epitope durch eine Hitzedenaturierung der Suspensionspräparate bzw. der bewachsenen Gold-Grids freizulegen. Jedoch konnten unter keinem der genannten Parameter Ergebnisse erzielt werden. Die vereinzelt detektierbaren Gold- bzw. Silberkörner traten vielmehr zufällig verteilt über das gesamte Präparat auf (Daten nicht gezeigt).

Aus zeitlichen Gründen war es nicht mehr möglich, Ultradünnschnitte des *M. thermoautotrophicus*-Stammes AG5 anzufertigen, der im Vergleich zu DeltaH deutlich mehr Fimbrien ausbildet und demnach höchstwahrscheinlich auch mehr Mth59 enthält.

6.2.2 Immunmarkierungen an Western- und Dot Blots

Zusätzlich zu den Immunmarkierungen an elektronenmikroskopischen Präparaten wurden auch verschiedene Markierungsversuche an Western- und Dot Blots durchgeführt, da hierbei von einer größeren Anzahl an freien Epitopen als bei den Ultradünnschnitten auszugehen war.

Zunächst sollten die Versuche mit grob fraktionierten Zellbestandteilen und einem Zelllysats von *M. thermoautotrophicus* durchgeführt werden. Hierzu wurde ein Liter stationär gewachsene Kultur des Stammes AG5 geerntet und die Zellen, wie unter II.5.2 beschrieben, über Behandlung mit der Pseudomurein-Endoisozeptidase PeiP und anschließendem Ultraschall aufgeschlossen. Durch Ultrazentrifugation wurde das Zelllysats (Überstand) von den größeren Zellbestandteilen getrennt, die als geschichtetes Pellet sichtbar wurden. Die oberste Lage bildete dabei ein sehr dünner und durchsichtiger Film (Fraktion 1), bei dem davon auszugehen war, dass es sich um Membranen handelte. Bei der mittleren, dicken Schicht des Pellets handelte es sich um einen bräunlich gefärbten Bereich (Fraktion 2). Dieser wurde von der Wandung des Zentrifugenröhrchens durch eine dünne, graue Schicht (Fraktion 3) abgegrenzt, bei der es sich, wie Lichtmikroskopie bestätigte, um Zellhüllen bzw. noch intakte Zellen handelte.

Die Fraktionen wurden resuspendiert und über SDS-PAGE analysiert, wobei sich zeigte, dass vor allem die Proteine der Fraktionen 2 und 3 nur unzureichend in das Trenngel eingewanderten. Durch dreistündige Inkubation aller Proben in 4 % (w/v) SDS konnten die Proteine erfolgreich solubilisiert und im SDS-Gel schwache Banden im interessanten Größenbereich von etwa 20 kDa verzeichnet werden (Daten nicht gezeigt). Trotzdem gelang über Western Blot in keiner der Fraktionen ein immunologischer Nachweis des Proteins Mth59. Einzig erfolgreich verlief eine Positivkontrolle mit rekombinantem Mth59.

Aufgrund der allgemein schlechten Übertragungseffizienz des zu untersuchenden Proteins vom SDS-Gel auf die Blot-Membran, wurde der Versuch auch über direktes Spotten der Proteine auf die mit Methanol aktivierte Membran wiederholt (Dot Blot). Auch hierbei konnte, selbst bei einem Titer von 1:1.000, keine Reaktion verzeichnet werden. Gleiches galt auch für den Ultrazentrifugationsüberstand, der hauptsächlich cytosolische Proteine enthalten sollte. Auch in diesem Fall konnte ein Fehler in der Versuchsdurchführung ausgeschlossen werden.

Es war zwar davon auszugehen, dass diese negativen Ergebnisse von einer sehr geringen, nicht nachweisbaren intrazellulären Menge des Proteins Mth59 herrührten, dennoch sollte überprüft werden, ob das vermeintliche Chaperon Teil der Mth60-Fimbrien ist. Hierzu wurde das Antiserum, das nach Immunisierung eines Kaninchens mit den Mth60-Fimbrien erhalten wurde, im Dot Blot gegen rekombinantes Mth59 eingesetzt. Als Referenz diente das ebenfalls rekombinant hergestellte Hauptfimbrin Mth60. Beide Proteine wurden in unterschiedlichen Verdünnungen auf die Membran gespottet und unter identischen Bedingungen detektiert. Zwar zeigte sich für Mth59 eine Reaktion, die lediglich um den Faktor 100 schwächer war im Fall der Positivkontrolle mit Mth60 (vgl. Anhang VI.4, Abb. VI.4 A), jedoch verdeutlichten weitere Versuche, dass es sich dabei nicht um eine spezifische Markierung handeln konnte: So wurde bei parallel durchgeführten Versuchen mit dem Mth59-Antiserum ebenfalls eine nur etwa 100-fach stärkere Reaktion für Mth59 im Vergleich zu Mth60 verzeichnet (vgl. VI.4, Abb. VI.4 B). Da das Mth59-Antiserum aber gegen rekombinant hergestelltes und aufgereinigtes Protein generiert worden war, konnte es sich bei dieser Kreuzreaktion nur um eine unspezifische Bindung handeln. Demzufolge war auch im umgekehrten Experiment von einer unspezifischen Reaktion zwischen dem Fimbrien-Antiserum und Mth59 auszugehen.

7 Polymerisationsstudien

Zur Überprüfung, ob das Hauptfimbrin Mth60 *in vitro* zur selbstständigen Ausbildung von Fimbrien fähig ist, wurde das rekombinante Protein (Konstrukt I, siehe III.3.2) nach der Aufreinigung und Dialyse in verschiedene Polymerisationsansätze eingesetzt. Diese wurden bei unterschiedlichen Temperaturen für variable Zeiträume inkubiert. Zusätzlich sollten die Einflüsse von zweiwertigen Ionen sowie des vermeintlichen Chaperons Mth59 auf das Polymerisationsverhalten von Mth60 hin analysiert werden. Die Analyse erfolgte zunächst mittels SDS-PAGE sowie durch Immunlokalisation mit Antikörpern, die gegen die Fimbrien von *M. thermoautotrophicus* generiert (siehe III.4.4) und somit in erster Linie gegen Mth60 gerichtet waren. Um eine Depolymerisierung eventuell entstandener Filamente zu verhindern, wurden die Proben im Vorfeld der Gelelektrophorese mit einem modifizierten Ladepuffer (ohne β -Mercaptoethanol und mit reduziertem SDS-Anteil) versetzt und nicht aufgeköcht.

Im Anschluss erfolgte eine elektronenmikroskopische Untersuchung aller Ansätze über die Herstellung von Suspensionspräparaten. Zur Aufkonzentrierung der Proben wurden diese mehrmals hintereinander auf die Grids aufgetragen. Als Negativkontrolle diente ein Ansatz, in dem die Proteidlösung durch Puffer ersetzt worden war. Damit sollten Artefakte ausgeschlossen werden, die auf die Pufferlösung zurückzuführen sind.

7.1 Variation von Temperatur und Inkubationsdauer

Die Proben setzten sich zusammen aus rekombinantem Protein, zweiwertigen Ionen und Natriumazid und wurden bei Temperaturen zwischen 8° und 95°C in der Regel für 1, 3 und 7 Tage inkubiert. Ausnahmen bildeten eine Langzeitinkubation bei 8°C (für 3 Monate) bzw. auch kürzere Inkubationszeiten von unter einem Tag (1 h, 3 h, 6 h, 9 h) im Falle des 65°C-Ansatzes.

Als Vergleichsprobe diente frisch isoliertes Mth60, das in gleicher Weise wie die Polymerisationsansätze analysiert wurde. Bereits kurz nach der Aufreinigung waren im SDS-Gel neben der Doppelbande bei etwa 17 kDa, die die monomere Form des prozessierten und nicht prozessierten Mth60 darstellte (siehe III.3.2), weitere schwache Banden auf einer Höhe von etwa 55, 80 und 120 kDa sichtbar (Abb. III.32 A, Spur 1). Außerdem konnte ein „Schmier“ an der Grenze zwischen Sammel- und Trenngel ausgemacht werden. Dass es sich bei den höhermolekularen Banden sowie dem Schmier ebenfalls um Mth60 handelte, wurde über Western Blot bestätigt (Abb. III.32 B, Spur 1). Dieses Ergebnis zeigte, dass sich das Protein sofort nach der Isolierung aus *E. coli* zusammenlagert. Im Elektronenmikroskop konnten aber trotz genauer Suche keinerlei Filamente gefunden werden, wonach das rekombinante Protein als Oligomer und nicht als sichtbares Polymer vorzuliegen schien und somit ein gutes Ausgangsmaterial für die Polymerisationsstudien darstellte.

Vergleichs-Ansätze bei RT, 37° und 65°C zeigten im SDS-Gel und Western Blot bereits nach einem Tag deutliche Unterschiede: Während die Bandenmuster bei RT und 37°C (Abb. III.32

A+B, Spuren 2+3) dem des frisch isolierten Proteins glichen, waren im 65°C-Ansatz kaum mehr Proteine detektierbar (Spur 4). Die höhermolekularen Banden und der Schmier waren komplett verschwunden und die Menge an Monomeren deutlich verringert. Nach sieben-tägiger Inkubation waren im silbergefärbten Gel der 65°C-Probe auch keine monomeren Formen des Proteins mehr zu finden (Abb. III.32 C, Spur 3).

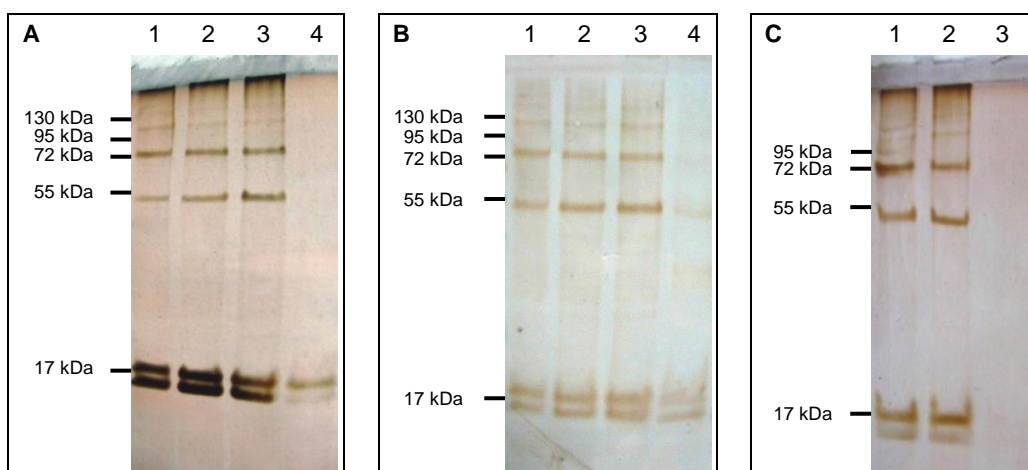


Abb. III.32: Analyse der Polymerisationsansätze nach Inkubation bei RT, 37° und 65°C. A: SDS-PAGE (12,5 % AA, silbergefärbt) des frisch isolierten Mth60 (1); vergleichend dazu die Polymerisationsansätze nach eintägiger Inkubation bei RT (2), 37° (3) und 65°C (4). B: Western Blot von A. 1° AK rabbit anti-Mth60-Fimbrien, 1:5.000; 2° AK goat anti-rabbit, 1:2.000. C: SDS-PAGE (12,5 % AA, silbergefärbt) der Polymerisationsansätze nach sieben-tägiger Inkubation bei RT (1), 37° (2), 65°C (3).

Durch TEM wurde gezeigt, dass die 65°C-Ansätze bereits nach eintägiger Inkubation eine hohe Anzahl an Fimbrien aufwiesen (Abb. III.33), die nur gelegentlich einzeln vorlagen (A). Meist handelte es sich um zwei miteinander assoziierte Filamente (B) oder um ganze Fimbrien-Netzwerke (C+D), was aufgrund der Adhäsionseigenschaften von Mth60 wenig verwunderlich erscheint. Daraus konnte gefolgert werden, dass die Proteine der 65°C-Ansätze derart polymerisiert vorlagen, dass sie nicht in das Gel einwandern und selbst in den Geltaschen keinerlei Signal erzeugen konnten.

Zur Bestimmung der Fimbrien-Durchmesser wurden entweder Teilbereiche herangezogen, an denen eindeutig erkennbar war, dass es sich um ein einzelnes Filament handelte bzw. Stellen mit mehreren nebeneinander liegenden Fimbrien. Eine solche Stelle mit vier unmittelbar benachbarten Fimbrien ist in Abb. III.33 D mit einem Pfeil gekennzeichnet. Hier konnte für die Strukturen eine gesamte Breite von 22 nm bestimmt werden, wodurch sich ein Einzeldurchmesser von 5,5 nm ergibt. Allgemein wurden Durchmesser mit einem Wert zwischen 5 und 6 nm ermittelt, was den nativen Fimbrien von *M. thermoautotrophicus* entspricht. Auch strukturell wichen die gebildeten Fimbrien nicht von der nativen Form ab. Ihre Länge variierte allerdings stark und reichte von etwa 100 nm bis hin zu ca. 3 µm. Allgemein waren kurze Filamente eher bei niedrigen Temperaturen bzw. kurzen Inkubationszeiten zu finden.

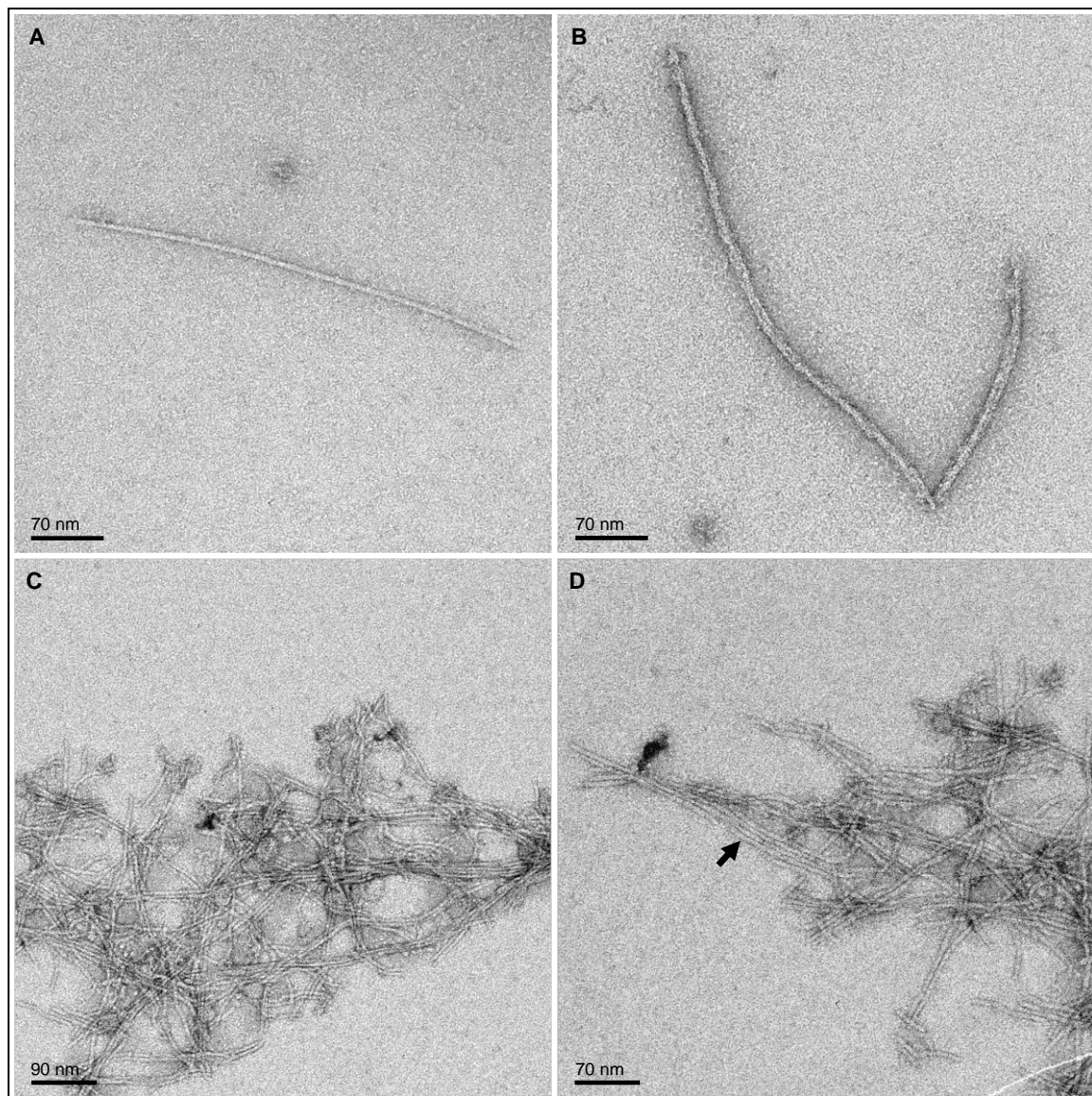


Abb. III.33: TEM-Aufnahmen der Polymerisationsansätze nach eintägiger Inkubation bei 65°C. Suspensionspräparate, kontrastiert mit UAc. A: einzelne Fimbrie. B: zwei miteinander verdrehte Filamente. C+D: Fimbriennetzwerke. Pfeil in D zeigt auf vier nebeneinander liegende Fimbrien, anhand derer der Durchmesser auf 5,5 nm bestimmt wurde.

Trotz der zahlreich beobachteten Fimbrien nach eintägiger Inkubation bei 65°C lagen bei kürzeren Inkubationszeiten von bis zu 9 h noch keinerlei Filamente vor. Im Gegensatz dazu entstand bei einer längeren Inkubation von Mth60 eine viel größere Anzahl an Fimbrien. Dies kann aus den TEM-Aufnahmen in Abb. III.34 A-C entnommen werden, die die nach drei Tagen bei 65°C entstandenen Filamente zeigen. Dabei geht aus C zusätzlich hervor, dass die Fimbrien deutlich an Länge gewonnen haben. Eine einwöchige Inkubation führte allerdings zu keiner weiteren Erhöhung der Fimbrienanzahl, vielmehr lagen die filamentösen Strukturen zunehmend stark miteinander verdreht vor (Abb. III.34 D-F).

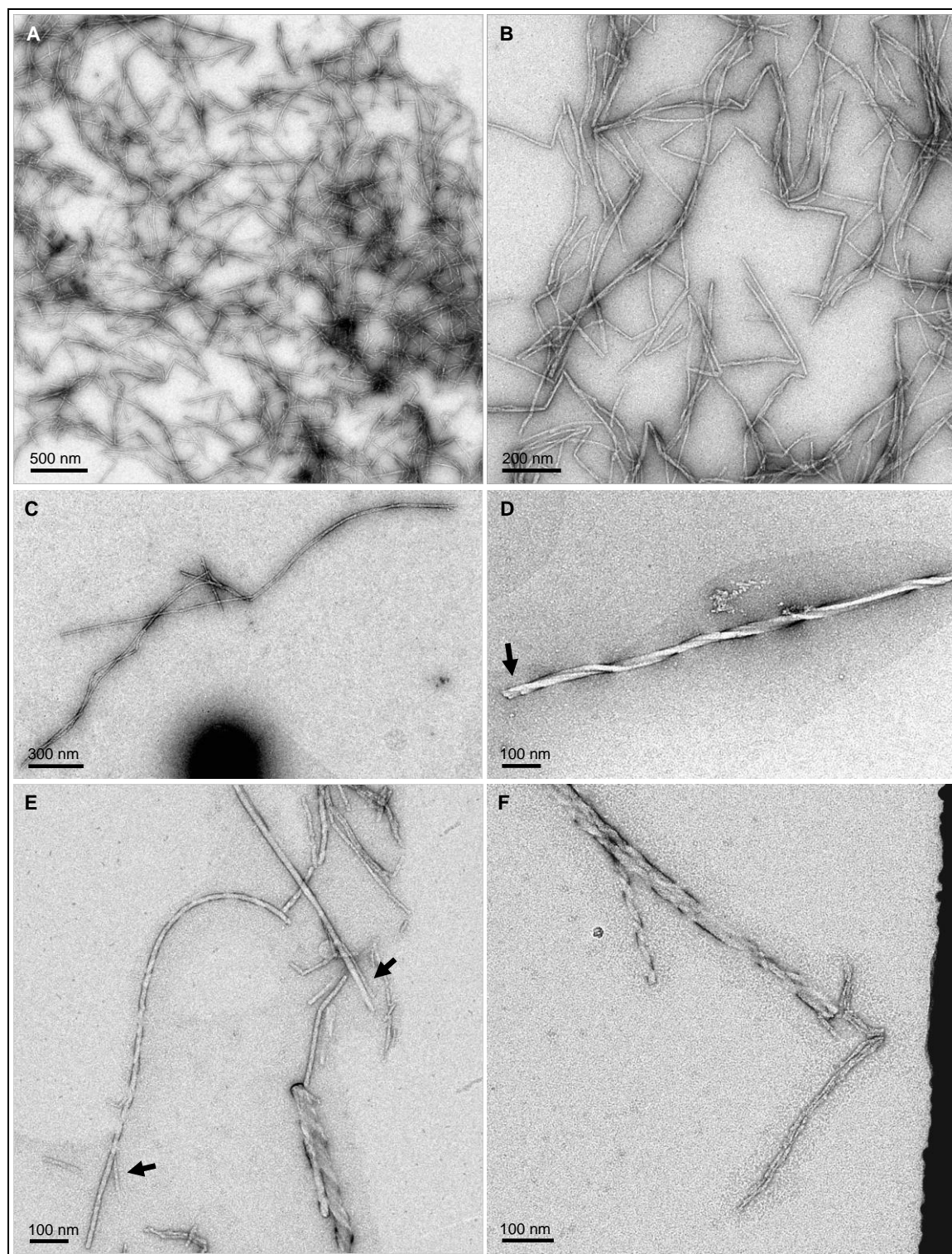


Abb. III.34: TEM-Aufnahmen der Polymerisationsstudien nach Inkubation bei 65°C für 3 bzw. 7 Tage. Suspensionspräparate, kontrastiert mit UAc. Nach dreitägiger Inkubation (A-C) finden sich viele, lange Fimbrien, die nach einwöchiger Inkubation (D-F) zunehmend verdreht vorliegen. Pfeil in D deutet auf das Ende einer „Fimbrienkordel“, die sich aus mindestens fünf einzelnen Filamenten zusammensetzt. Pfeile in E zeigen auf einzelne Fimbrien.

Die elektronenmikroskopische Untersuchung der Ansätze bei RT und 37°C zeigte – wie bereits aufgrund der SDS-PAGE (vgl. Abb. III.32) vermutet – keine (RT) bzw. nur eine minimale (37°C) Zusammenlagerung der Proteine zu Fimbrien. So fanden sich im 37°C-Ansatz nach siebentägiger Inkubation lediglich ein paar Fimbrienfragmente, die mit einer Länge von

maximal 500 nm als verhältnismäßig kurz zu bezeichnen waren (Daten nicht gezeigt). Bei niedrigeren Temperaturen ließ sich auch nach länger dauernder Inkubation (3 Monate bei 8°C) keinerlei Polymerisierung erkennen. Verglichen mit dem Ansatz bei 37°C waren bei 45° und 55°C zunehmend mehr Fimbrien zu beobachten, deren Anzahl allerdings geringer war als nach Inkubation bei 65°C. Die elektrophoretische Auftrennung der Proteine aus den 45°- und 55°C-Ansätzen zeigte auch hier lediglich eine Abnahme der monomeren und oligomeren Proteinbanden auf. Eine stufenweise Verschiebung der Banden in den höhermolekularen Bereich trat nicht auf (Daten nicht gezeigt).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass Mth60 ab einer Temperatur von etwa 37°C spontan zu polymerisieren beginnt und der Grad der Polymerisation bis zur optimalen Wachstumstemperatur von *M. thermoautotrophicus* (65°C) stetig ansteigt. Interessant war die Frage, ob es auch bei höheren Temperaturen zur Fimbrienbildung kommt. Um dies zu überprüfen, wurden Ansätze vergleichend bei 65°, 75°, 85° und 95°C inkubiert. In diesem Fall mussten Vorkehrungen gegen ein vorzeitiges Verdunsten der Proben getroffen werden. Ein erster Versuch hierzu stellte die Übersichtung des Ansatzes mit Mineralöl dar. Hierbei konnten allerdings selbst im Kontrollansatz bei 65°C keinerlei Fimbrien detektiert werden, was zur Vermutung führte, dass Mth60 bzw. die gebildeten Fimbrien an das Mineralöl gebunden hatten. Als zweite Möglichkeit zur Minimierung der Verdunstung wurde die Inkubation des Reaktionsgefäßes in einer Druckflasche, die mit 2 bar Überdruck begast wurde, untersucht. Jedoch konnte auch der Überdruck das Verdunsten nicht verhindern, so dass die Probe nach mehrtägiger Inkubation als Flüssigkeitsfilm an der Glaswand der Druckflasche vorzufinden war. Letztendlich wurden für die Polymerisationsstudien bei höheren Temperaturen größere Ansätze gewählt (100 µl statt 50 µl) und die Inkubation auf maximal drei Tage beschränkt. Die Deckel der Reaktionsgefäße wurden mit Parafilm umwickelt und mit *Cap Locks* vor dem Aufspringen gesichert. Dies konnte das Verdunsten zwar nicht verhindern, jedoch in ausreichender Weise reduzieren. Vor der Analyse der Proben wurden die Volumina mit H₂O_{millipore} entsprechend angeglichen.

Gelelektrophoretische Untersuchungen dieser Ansätze ließen auf eine deutlich verstärkte Polymerisierung von Mth60 bei ansteigenden Inkubationstemperaturen schließen. Diese erhöhte Fimbrienbildung konnte elektronenmikroskopisch eindeutig bestätigt werden: Abb. III.35 zeigt die nach zweitägiger Inkubation bei 95°C entstandenen Fimbrien. Diese sind in Form und Aussehen identisch mit den Filamenten, die im 65°C-Ansatz beobachtet wurden, ihre Anzahl ist jedoch um ein Vielfaches erhöht. Eine weitere Auffälligkeit der Polymerisationsansätze bei 65°, 75°, 85° und 95°C war eine zunehmend eintretende Flockenbildung im Reaktionsgefäß, die bei der höchsten Temperatur am stärksten auftrat. Elektronenmikroskopie dieser „Flocken“ zeigte, dass es sich dabei um Partikel handelte, an die eine immense Anzahl an Fimbrien gebunden war (Daten nicht gezeigt).

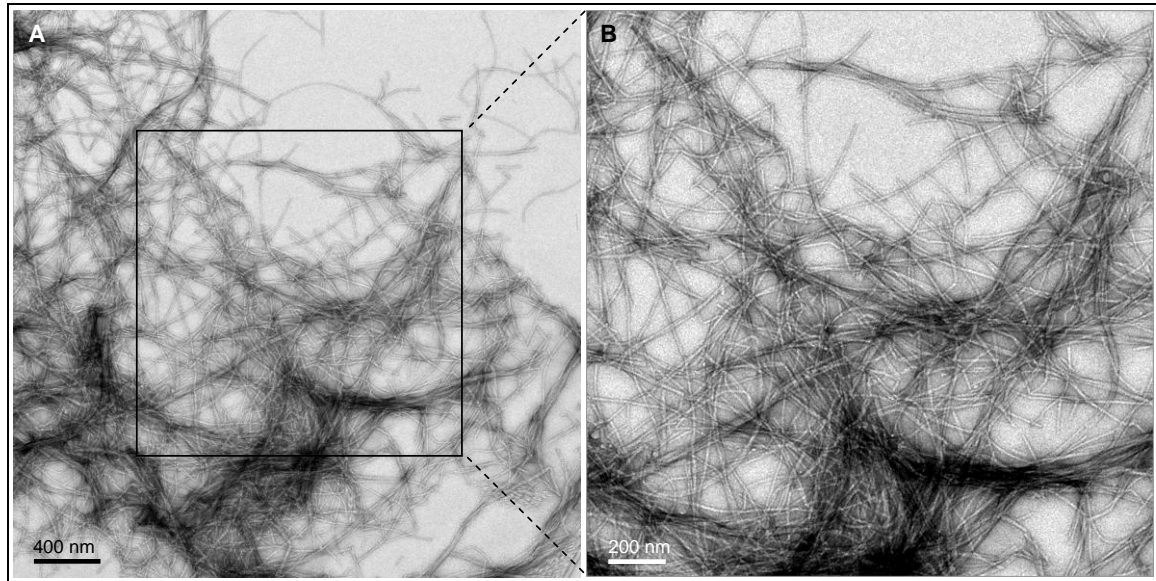


Abb. III.35: TEM-Aufnahmen eines Polymerisationsansatzes nach zweitägiger Inkubation bei 95°C. Suspensionspräparat, kontrastiert mit UAc. Mth60 zeigt bei einer Inkubationstemperatur von 95°C eine sehr starke Polymerisationsfähigkeit.

7.2 Einfluss zweiwertiger Ionen

Die oben beschriebenen Polymerisationsversuche fanden unter Zugabe von je 20 mM MgCl_2 und CaCl_2 statt und sollten nun in Abwesenheit von zweiwertigen Kationen wiederholt werden. Zu diesem Zweck wurden vier Ansätze pipettiert (Positivkontrolle mit MgCl_2 und CaCl_2 ; nur MgCl_2 ; nur CaCl_2 ; ohne 2^+ -Ionen) und drei Tage bei 65°C inkubiert.

Die elektronenmikroskopische Auswertung lieferte eindeutige Ergebnisse: Es zeigte sich, dass Mth60 auch ohne die stabilisierende Wirkung von zweiwertigen Ionen selbstständig zu Fimbrien polymerisiert (Abb. III.36 A+B). Dabei schien die Anzahl der Fimbrien im Vergleich zum Kontrollansatz mit zweiwertigen Ionen nur minimal verringert, auch optisch glichen diese Filamente den bisher beobachteten Fimbrien. In einigen Fällen konnten jedoch mehrere dünne und nebeneinanderliegende „Perlenschnüre“ beobachtet werden (Abb. III.36 C-E). Zur Bestimmung der Periodizität dieser Strukturen wurden gut kontrastierte Bereiche mit Hilfe der Software EM-Menü 4.0 maskiert und das Powerspektrum aufgezeichnet. Dabei konnten lediglich in einem Fall (Abb. III.36 E, schwarzer Kasten) eindeutige Reflexe ausgemacht werden. Das entsprechende Powerspektrum findet sich in Abb. III.31 F und lässt Frequenzen von etwa $(5 \text{ nm})^{-1}$ erkennen. Genaue Messungen ergaben einen Wert von $(4,7 \text{ nm})^{-1}$. Unter Berücksichtigung der Molekularmasse des eingesetzten Proteins von etwa 16 kDa könnte es sich bei diesen „Perlen“ um Tetramere handeln, ganz sicher jedenfalls um Oligomere.

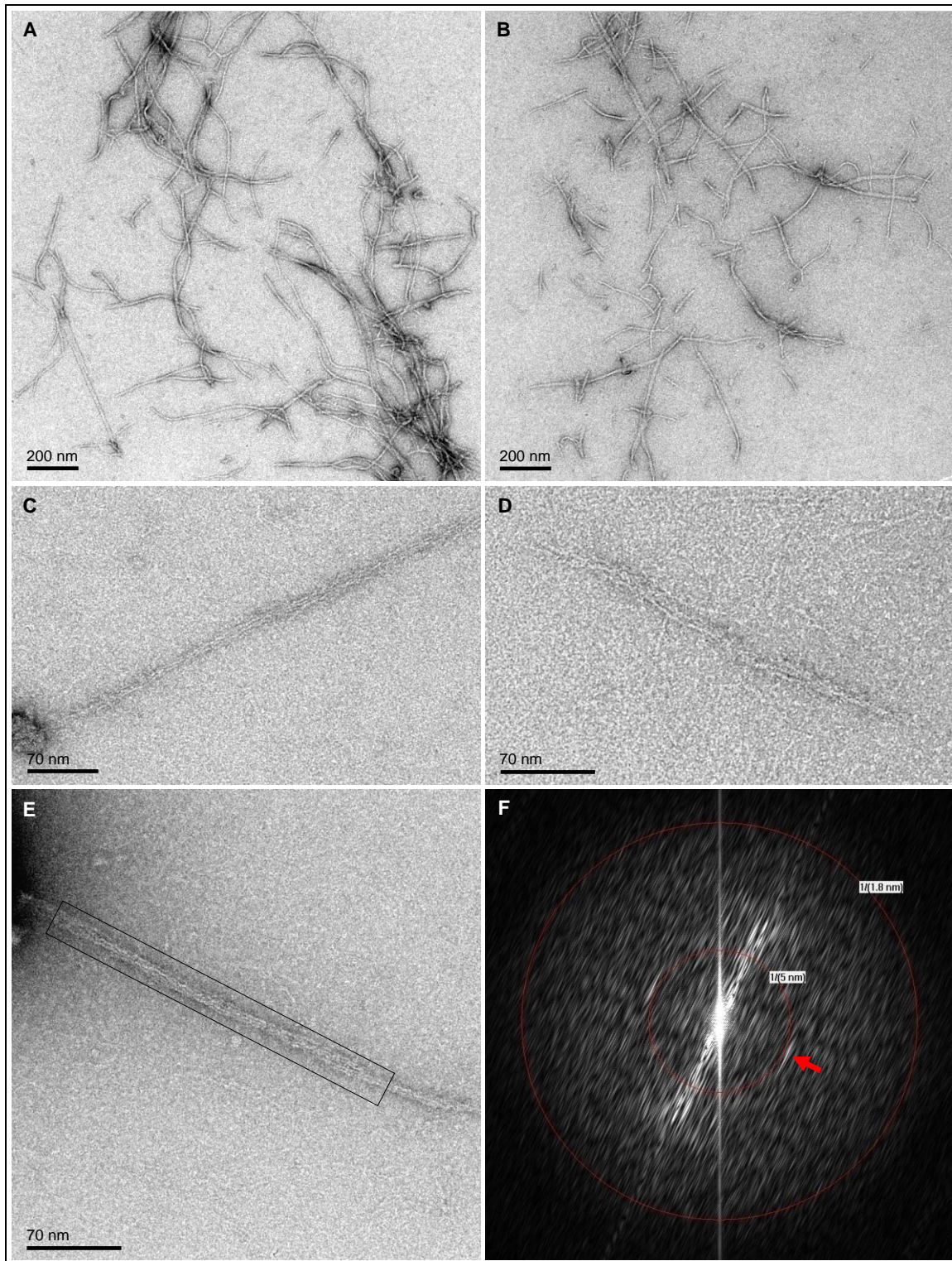


Abb. III.36: Polymerisationsstudien in Abwesenheit zweiwertiger Ionen nach dreitägiger Inkubation bei 65°C. A-E: Suspensionspräparate, kontrastiert mit UAc. Neben normal aussehenden Fimbrien (A+B) finden sich auch „perlen-schnurartige“ Strukturen (C-E). F: Powerspektrum des in E gekennzeichneten Bereichs zeigt nach Maskierung einen Reflex bei $(4,7 \text{ nm})^{-1}$, dieser ist mit einem roten Pfeil markiert.

Im Polymerisationsansatz, der ausschließlich Mg^{2+} -Ionen enthielt, waren genauso viele Fimbrien zu finden, wie im Kontrollansatz mit beiden zweiwertigen Kationen. Neben der Anzahl war auch das Erscheinungsbild identisch (Abb. III.37 A+B), perlenschnurartige Strukturen waren nicht zu finden. Damit scheint Mg^{2+} die spontane Assoziation der Fimbrien positiv zu beeinflussen.

Bei alleiniger Anwesenheit von Ca^{2+} -Ionen wurde dagegen eine deutlich verringerte Anzahl an fimbrienartigen Strukturen detektiert. Hier waren nur ganz vereinzelt Fimbrienfragmente zu finden und damit deutlich weniger als in den anderen drei Ansätzen (Abb. III.37 C+D).

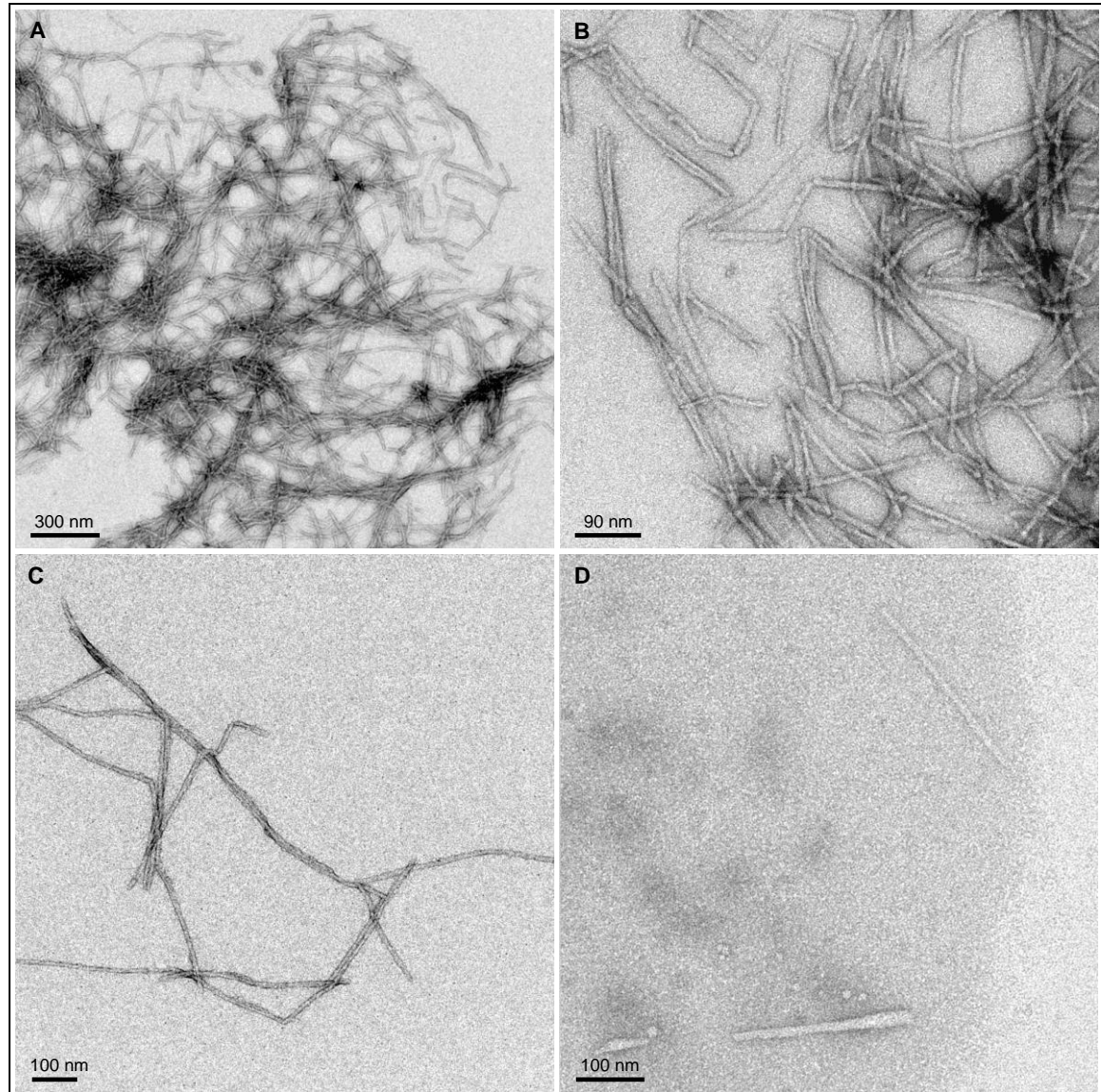


Abb. III.37: TEM-Aufnahmen der Polymerisationsansätze mit nur einer Art zweiwertiger Ionen nach dreitägiger Inkubation bei 65°C. Suspensionspräparate, kontrastiert mit UAc. A+B: Ansätze mit $MgCl_2$ zeigen Fimbrien, deren Anzahl und Form identisch mit der Positivkontrolle (mit $MgCl_2$ und $CaCl_2$) ist. C+D: Ansätze mit ausschließlich $CaCl_2$ lassen nur vereinzelt Fimbrien und kurze Fimbrienfragmente erkennen.

Trotz der eindeutigen elektronenmikroskopischen Ergebnisse hätte die ausschließliche Auswertung der SDS-Gele und Western Blots auf andere Ergebnisse schließen lassen. Entsprechend der Beobachtungen aus III.7.1 wäre die beste Polymerisation im Ansatz mit Ca^{2+} -Ionen zu erwarten gewesen, da in diesem Fall die niedrigste Proteinmenge detektiert wurde. Das schlechteste Ergebnis hätte der Ansatz ohne zweiwertige Ionen liefern müssen (Daten nicht gezeigt). Dies konnte elektronenmikroskopisch allerdings zu wiederholtem Male und ohne jeglichen Zweifel widerlegt werden.

7.3 Einfluss von Mth59

Da eine Beteiligung des putativen Chaperons Mth59 an der Assemblierung der Mth60-Fimbrien unter Annahme einer Analogie zum bakteriellen System wahrscheinlich erscheint, sollte der Einfluss dieses Proteins auf die Polymerisationsfähigkeit von Mth60 hin untersucht werden. Zu diesem Zweck wurden die rekombinanten Proteine in verschiedenen Verhältnissen gemischt (Mth59:Mth60 von 1:1; 1:100; 1:1.000; 1:2.000) und vier Tage bei 65°C inkubiert. Um einen negativen Einfluss des N-terminalen His-Tags von Mth59 auszuschließen, wurden parallel Versuche angesetzt, bei denen der Tag im Vorfeld mittels Thrombin abgespalten worden war. Der Erfolg dieser Abspaltung wurde elektrophoretisch bestätigt. Als Kontrolle für die Versuche diente ein Ansatz, der ausschließlich Mth60 enthielt. Alle Versuche fanden in Anwesenheit von Mg^{2+} und Ca^{2+} statt.

Vorab lässt sich sagen, dass keinerlei Unterschiede bezüglich des His-Tags zu verzeichnen waren, weswegen nicht gesondert auf diese Ergebnisse eingegangen wird. Elektronenmikroskopische Untersuchungen zeigten ganz eindeutig, dass bei einem Mischungsverhältnis der beiden Proteine von 1:1 kaum Fimbrien gebildet wurden und die Grids stets sehr „verunreinigt“ wirkten (Abb. III.38 A-C). Bereits in den Reaktionsgefäßen konnte eine deutliche Flockenbildung beobachtet werden, die in allen anderen Ansätzen ausblieb. Im Elektronenmikroskop erschienen diese Flocken als unregelmäßige Strukturen, so dass es sich dabei um unregelmäßige Proteinaggregate gehandelt haben könnte.

Wurde Mth59 um den Faktor 100 verdünnt eingesetzt, so nahmen die „Verunreinigungen“ auf den Grids deutlich ab, die Zahl der Fimbrien dagegen zu (Abb. III.38 D-F). Die Filamente waren lang, gut strukturiert und wiesen den erwarteten Durchmesser von etwa 5-6 nm auf. Die Fimbrien zeigten auch hier eine Tendenz, miteinander zu verdrillen (D). Verglichen mit der Positivkontrolle, in der nur Mth60 eingesetzt wurde, war die Anzahl der Fimbrien deutlich geringer.

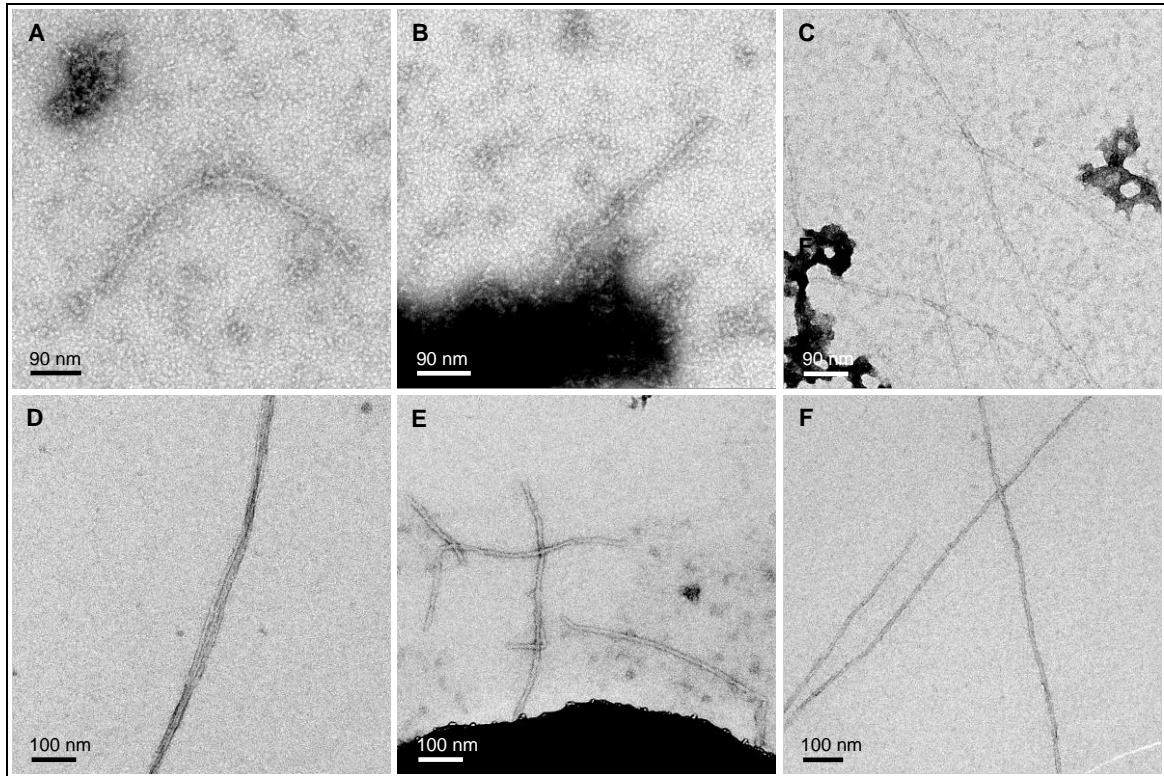


Abb. III.38: TEM-Aufnahmen der Polymerisationsansätze in Anwesenheit des putativen Chaperons Mth59 in Verhältnissen Mth59:Mth60 von 1:1 und 1:100. Suspensionspräparate, kontrastiert mit UAc. A-C: Ansätze mit beiden Proteinen im Verhältnis 1:1 zeigen kaum Fimbrien, aber ein stark „verunreinigtes“ Grid. D-F: Nach Inkubation von Mth59:Mth60 im Verhältnis 1:100 sind weniger Präzipitate und deutlich mehr Fimbrien entstanden.

Polymerisationsansätze, die die beiden Proteine im Verhältnis Mth59:Mth60 von 1:1.000 enthielten, zeichneten sich durch eine höhere Fimbrienmenge aus verglichen mit dem Ansatz, in dem Mth59 zehnfach konzentrierter eingesetzt worden war (1:100). Wie aus Abb. III.39 hervorgeht, waren die Filamente allerdings sehr stark miteinander verdreht.

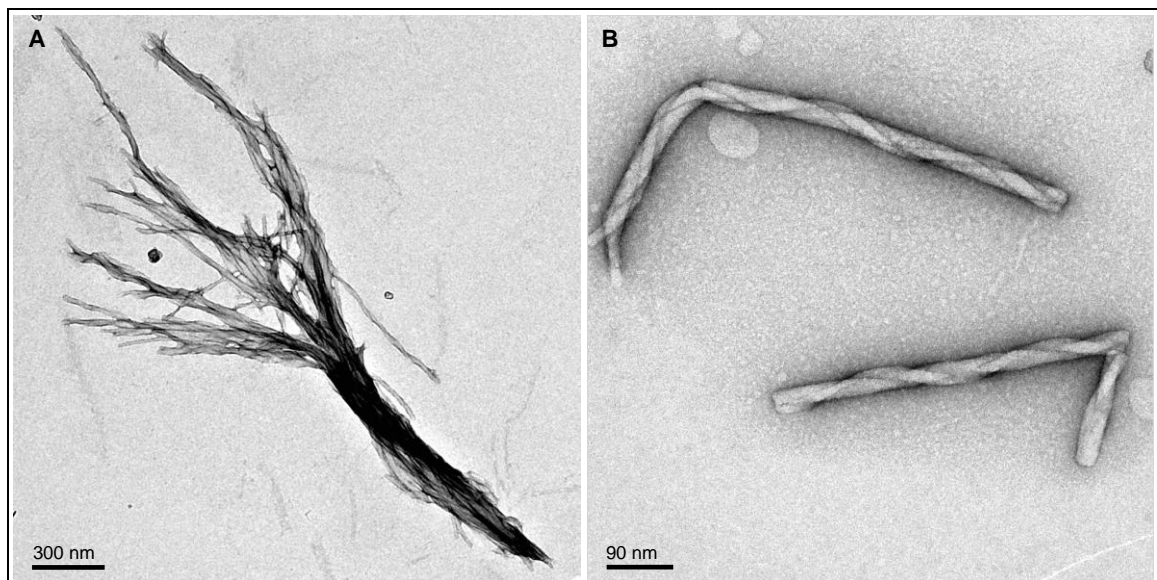


Abb. III.39: TEM-Aufnahmen der Polymerisationsansätze in Anwesenheit des putativen Chaperons Mth59 im Verhältnis Mth59:Mth60 von 1:1.000. Suspensionspräparate, kontrastiert mit UAc. Die zahlreich entstandenen Fimbrien sind sehr stark aneinander gebunden und miteinander verdreht.

Identische Ergebnisse bezüglich Anzahl und Aussehen der gebildeten Fimbrien wurden auch bei einem Verhältnis der Proteine von 1:2.000 erzielt (Daten nicht gezeigt). Insgesamt erschien die Fimbrienmenge in den Ansätzen mit den niedrigsten Verdünnungsstufen von Mth59 dennoch geringer als in der Kontrolle, die ausschließlich Mth60 enthielt. Aufgrund der sehr starken Zusammenlagerung der Filamente fiel eine eindeutige Aussage allerdings schwer.

Eine Analyse der einzelnen Ansätze über Gelelektrophorese und Western Blot ließ bis auf eine hohe Menge an monomerem Protein im Falle des 1:1-Verhältnisses keine weiteren Unterschiede erkennen (Daten nicht gezeigt).

IV Diskussion

1 Quantitative Analysen der mit *mth60* co-transkribierten Gene

Die Organisation mehrerer funktionell verwandter Gene innerhalb eines Operons ist unter Archaeen und Bakterien weit verbreitet. So werden auch die Gene, deren Produkte an der Assemblierung der bakteriellen (Fauconnier *et al.*, 1997; Kutsukake *et al.*, 1988) bzw. archaeellen Flagellen (Ng *et al.*, 2006; Jarrell & Albers, 2012) beteiligt sind, als polycistronische mRNAs transkribiert. Gleiches trifft auch auf die Gene zu, die für bakterielle Fimbrien und Pili kodieren (van Ham *et al.*, 1994; Mattick, 2002; Wall & Kaiser, 1999). Eine Co-Transkription wird zudem für die Gene angenommen, die an der Assemblierung bestimmter Pili in *Sulfolobus* beteiligt sind (Fröls *et al.*, 2008; Henche *et al.*, 2012). Dementsprechend ist es nicht erstaunlich, dass auch *mth60*, das Gen, das die Information für das Hauptfimbrin von *M. thermoautotrophicus* enthält, mit benachbarten Genen co-transkribiert wird (Sarbu, 2009). Dabei handelt es sich, wie über Reverse-Transkriptions-PCR (RT-PCR) und Northern Blots ermittelt wurde, um zwei verschiedene, aber überlappende Transkriptionseinheiten: Das eine Operon umfasst *mth61/mth60*, das zweite *mth60/mth59/mth58*. Auch die Tatsache, dass die Gene, die wohl an der Assemblierung der Mth60-Fimbrien beteiligt sind, auf zwei Transkriptionseinheiten verteilt sind, ist keine Seltenheit. So befinden sich zum Beispiel die fünf Flagelline von *Halobacterium salinarum* in zwei verschiedenen Transkriptionseinheiten (Gerl & Sumper, 1988). Ein weiteres Gencluster umfasst die akzessorischen Flagelline (Patenge *et al.*, 2001).

Bereits in den Northern Blots konnte gezeigt werden, dass *M. thermoautotrophicus* eine deutlich höhere Menge an *mth60*-mRNA enthält verglichen mit allen anderen (Co-)Transkripten der vermeintlich Fimbrien-spezifischen Gene (Sarbu, 2009). Dies sollte über quantitative RT-PCR (qRT-PCR) näher untersucht werden. Zu diesem Zweck wurde Gesamt-RNA isoliert, in cDNA umgeschrieben und in die Reaktion eingesetzt. Über die Wahl verschiedener Primer konnten die ursprünglichen Mengen der in der RNA enthaltenen (Co-)Transkripte aus der cDNA heraus ermittelt werden. Dies geschah über absolute Quantifizierung unter Zuhilfenahme eines entsprechenden Plasmids, so dass das Ergebnis als Kopien pro ng cDNA angegeben werden konnte. Da diese für die cDNA erhaltenen Werte aufgrund der reversen Transkription mit den Werten der (m)RNA korrelieren, wird in Folge zur Vereinfachung allgemein von „Transkripten“ und „mRNA-Mengen“ gesprochen.

Zunächst sei erwähnt, dass auch über qRT-PCR eindeutige Co-Transkriptionen im Bereich der Gene *mth61* bis *mth58* verzeichnet wurden. Über die mitgeführten Kontrollen konnte ausgeschlossen werden, dass die erhaltenen Signale von geringen Spuren genomischer DNA herrührten. Der erneute Nachweis der beiden einzelnen Transkriptionseinheiten *mth61/mth60* und *mth60/mth59/mth58* konnte nicht erfolgen, weil die Amplifikatlänge den für eine qRT-PCR optimalen Wert von etwa 150 Basenpaaren deutlich überstiegen hätte. Allerdings wurde eindeutig bestätigt, dass *M. thermoautotrophicus* eine im Vergleich zu allen

anderen überprüften (Co-)Transkripten signifikant erhöhte Menge an monocistronischer *mth60*-mRNA enthält. Zwar kann aus der mRNA-Menge nicht zwingend auf die tatsächlich gebildete Proteinmenge geschlossen werden, jedoch liefert sie einen deutlichen Hinweis darauf, dass Mth60 in größerer Menge synthetisiert wird. Dies ist nicht erstaunlich, bedenkt man, dass dieses Protein das Hauptfimbrien darstellt.

Zum besseren Verständnis der folgenden Erläuterungen wird an dieser Stelle auf die Abbildungen III.2 und III.3 im Ergebnisteil verwiesen. Mit 456 Kopien/ng cDNA übersteigt *mth60* deutlich die Transkriptmengen der anderen Gene *mth61* (78 Kopien/ng cDNA), *mth59* (63 Kopien/ng cDNA) und *mth58* (138 Kopien/ng cDNA). Somit kann die hohe Menge an *mth60*-mRNA nicht allein dadurch erklärt werden, dass dieses Gen gleichzeitig Teil zweier Transkriptionseinheiten ist. Ein möglicher Grund für die große Menge an Einzeltranskript wäre, dass *mth60* zusätzlich auch als monocistronische mRNA transkribiert wird. Dies erscheint vor allem im Rahmen des *mth60/mth59/mth58*-Operons möglich, wenn die Ablesung der Gene zu einem gewissen Teil in der intergenen Region zwischen *mth60* und *mth59* abgebrochen wird. Die Wahrscheinlichkeit hierfür ist groß, schließlich muss sich stromabwärts von *mth60* ein Terminator für die Transkriptionseinheit *mth61/mth60* befinden. Dabei könnte es sich um sieben Thyminreste handeln (vgl. VI.2), die entsprechend *in vivo* Untersuchungen an *Thermococcus kodakarensis* ein intrinsisches Terminationssignal der archaeellen Transkription darstellen. Demnach reduzieren acht Thyminreste die Transkription der nachfolgenden Gene um 98 %, Oligo(dT)-Sequenzen mit vier bis sieben Thyminen verringern sie immerhin um mindestens 70 % (Santangelo *et al.*, 2009). Handelt es sich bei der genannten Basenabfolge tatsächlich um einen „schwachen“ Terminator, so wäre es denkbar, dass zur Synthese der bicistronischen *mth61/mth60*-mRNA, die nachweislich 3' von *mth60* endet (Sarbu, 2009), zusätzlich noch weitere Transkriptionsterminationsfaktoren mitwirken.

Während in Bakterien zahlreiche Attenuatoren und Riboswitches identifiziert wurden, die die Genexpression durch Kontrolle der intrinsischen Termination regulieren, gibt es noch keine Daten zu ähnlichen Regulationsmechanismen bei Archaeen (Santangelo *et al.*, 2009). Dass allerdings Regulationen stattfinden, zeigt sich auch bei der Transkription verschiedener archaeeller, Flagellen-kodierender Gencluster (Thomas *et al.*, 2001). Als Beispiel ist *Methanococcus voltae* zu nennen, dessen Flagellen-Gene in zwei Transkriptionseinheiten abgelesen werden. Die erste Transkriptionseinheit umfasst lediglich das Flagellin *flaA*, das einzeln transkribiert wird. Eine zweite Einheit bilden die Flagellingene *flaB1*, *flaB2*, *flaB3* sowie die Gene für die akzessorischen Proteine, die an der Assemblierung der Flagellen beteiligt sind. Die Transkription des letztgenannten Operons startet von einem Promotor, der stromaufwärts von *flaB1* lokalisiert ist. Dennoch finden sich in den Zellen mehrere verschiedene Transkripte in unterschiedlichen Mengenverhältnissen: Die höchste Transkriptmenge stellt die bicistronische mRNA aus *flaB1* und *flaB2* dar, wobei hier ebenfalls auffällt, dass sich

zwischen *flaB2* und *flaB3* eine Oligo(dT)-Sequenz befindet. In geringeren Anteilen wird auch eine polycistronische mRNA der Gene *flaB1*, *flaB2*, *flaB3*, *flaC* und *flaD* synthetisiert. Zu einem wiederum noch schwächeren Anteil werden zusätzlich die Gene *flaE*, *flaF* und *flaG* mit den bereits genannten Sequenzen co-transkribiert. Für *flaH*, *flaI* und *flaJ* konnte über Northern Blot und Reverse-Transkriptions-PCR kein mRNA-Transkript detektiert werden, weswegen die Autoren davon ausgingen, dass diese Gene entweder noch schwächer transkribiert werden, sie in anderen als den untersuchten Wachstumsphasen exprimiert werden oder die entstehende mRNA instabil ist (Kalmokoff & Jarrell, 1991; Thomas *et al.*, 2001).

Eine solche Regulation der Transkription macht Sinn, bedenkt man, dass es sich bei den (Haupt-)Flagellinen um diejenigen Proteine handelt, die für die Assemblierung der Flagellen in großer Anzahl benötigt werden, während nur geringe Mengen der akzessorischen Proteinen mitwirken. Aus diesem Grund finden sich auch im *fla* Gencluster von *Sulfolobus acidocaldarius* zwei Promotoren. Der erste Promotor ist 5' vom ersten Gen, dem Hauptflagellin FlaB (Crenarchaeoten weisen in der Regel nur ein Flagellin auf; Jarrell & Albers, 2012) lokalisiert und steuert die Transkription dieses Gens unabhängig von den akzessorischen Genen, deren konstitutive und schwache, basale Transkription durch einen zweiten Promotor ermöglicht wird. Durch Tryptophanmangel wird die Expression des *flaB*-Promotors stark induziert, wodurch eine schnelle Assemblierung der Flagellen gewährleistet wird (Lassak *et al.*, 2012).

Eine weitere Erklärung für die *mth60*-Einzeltranskriptmenge, die auch gegenüber der untersuchten intergenen Regionen und damit den Co-Transkripten *mth61/mth60*, *mth60/mth59* und *mth59/mth58* hoch erscheint, könnte in instabilen polycistronischen mRNAs begründet liegen. Die qRT-PCR zeigt nämlich die in der Zelle angesammelten Transkriptmengen an, die nicht nur in einer unterschiedlich großen Syntheserate begründet liegen, sondern auch durch die Stabilität der einzelnen mRNAs beeinflusst werden. So wurde für *Sulfolobus* gezeigt, dass die mRNA-Stabilität deutlich von der Länge des Transkriptes abhängt und längere Transkripte eine zunehmend kürzere Halbwertszeit aufweisen (Andersson *et al.*, 2006). Wie bereits erwähnt, wird eine solche Instabilität der mRNA auch als mögliche Erklärung für die unterschiedlichen polycistronischen Transkriptmengen des *fla* Genclusters von *M. voltae* in Erwägung gezogen (Thomas *et al.*, 2001).

Ebenfalls denkbar ist eine posttranskriptionelle Spaltung der polycistronischen mRNA, die verschieden stabile Teil-Transkripte entstehen lässt. Nachgewiesen ist eine solche posttranskriptionelle Spaltung im Fall der Pap-Pili von *E. coli*: Hier wird die bicistronische *papA/papB*-mRNA in der intergenen Region durch die RNaseE in zwei Transkripte gespalten. Diese sind unterschiedlich stabil, wodurch sich das Transkript von *papA*, dessen Genprodukt das Hauptpilin darstellt, um den Faktor 40 stärker in der Zelle ansammelt verglichen mit dem *papB*-Transkript, das für einen Transkriptionsaktivator kodiert (Nilsson &

Uhlin, 1991). Mithilfe von Mutationen, die eine Spaltung der bicistronischen mRNA durch die Endonuklease verhinderten, wurde gezeigt, dass es aufgrund der Instabilität des Gesamt-Transkriptes und der daraus resultierenden, reduzierten PapA-Menge zu kurzen Zellanhängen an der Oberfläche von *E. coli* kommt (Nilsson *et al.*, 1996).

Ein ähnlicher Mechanismus zur Regulation der Genexpression auf posttranskriptioneller Ebene wäre auch für *M. thermoautotrophicus* denkbar. Dabei könnten die polycistronischen mRNAs gespalten werden und in einer stabilen *mth60*-mRNA sowie in weniger stabilen *mth61*-, *mth59*- und *mth58*-mRNAs resultieren.

Auffällig bei den erhaltenen Ergebnissen der qRT-PCR ist auch, dass die Menge des bicistronischen *mth61/mth60*-Transkriptes mit 38 Kopien/ng cDNA niedriger ist, als die des Einzeltranskriptes von *mth61* (78 Kopien/ng cDNA). Auch hier würde eine (zumindest zum Teil stattfindende) posttranskriptionelle Spaltung der bicistronischen mRNA erklären, dass mehr *mth61*- als *mth61/mth60*-mRNA in den Zellen zu finden ist. Eine weitere Möglichkeit bestünde auch darin, dass *mth61* in geringen Anteilen zusätzlich auch alleine, als monocistronische mRNA transkribiert wird, was durch einen schwachen Terminator am 3'-Ende des *mth61*-ORFs erreicht werden könnte. Thyminreiche Sequenzabschnitte (T₅) finden sich auch an dieser Stelle des Genoms.

Genauso erstaunlich sind auch die unterschiedlichen Mengen der (Co-)Transkripte im *mth60/mth59/mth58*-Operon. Neben der bereits erwähnten, deutlich erhöhten Menge des *mth60*-Einzeltranskriptes, fällt auf, dass auch die restlichen mRNAs in variierenden Mengen in der Zelle enthalten sind. So ist die Co-Transkriptmenge in der intergenen Region von *mth60/mth59* mit 12 Kopien/ng cDNA geringer, als die Menge an *mth59*-mRNA (63 Kopien/ng cDNA). Betrachtet man die Transkriptmengen, die sich weiter stromabwärts der DNA ergeben haben, so zeigt sich, dass diese stetig ansteigen: Die Menge der *mth59/mth58*-Co-Transkripte beträgt 99 Kopien/ng cDNA, während vom Gen *mth58* 138 Kopien/ng cDNA vorzufinden sind. Damit kann die vom 5'- zum 3'-Ende abnehmende Transkriptmenge nicht mit einem zwischengeschalteten schwachen Terminator begründet werden. Möglicherweise wird die polycistronische *mth60/mth59/mth58*-mRNA posttranskriptionell in verschiedenen stabile Teil-Transkripte gespalten. Ferner wäre auch die Anwesenheit eines zusätzlichen Promotors denkbar.

Bei der Interpretation dieser Ergebnisse muss allerdings auch bedacht werden, dass die stabilen Zellwände von *M. thermoautotrophicus* im Zuge der RNA-Isolierung mechanisch aufgeschlossen wurden. Zwar bestätigte eine elektrophoretische Analyse die Qualität der RNA durch deutlich sichtbare 23S und 16S rRNA-Banden (ca. 3.000 und 1.500 Basen lang), allerdings könnte es dennoch zu einer gewissen Fraktionierung vor allem der längeren mRNAs gekommen sein. So zeichnet sich die polycistronische *mth60/mth59/mth58*-mRNA durch eine Länge von etwa 1.500 Basen aus, während die *mth61/mth60*-mRNA 1.200 Basen umfasst.

Auch wenn die unterschiedlichen Transkriptmengen der untersuchten Gene und intergenen Regionen zahlreiche Fragen aufkommen lassen, so konnte dennoch eindeutig gezeigt werden, dass es zu Co-Transkriptionen im Bereich der Gene *mth61-mth58* kommt. Damit scheinen die als hypothetische Proteine annotierten Genprodukte von *mth61*, *mth59* und *mth58* an der Assemblierung der Mth60-Fimbrien beteiligt zu sein.

Die Funktionen von Mth61 und Mth58 sind unbekannt und konnten auch im Rahmen dieser Arbeit aufgrund von Schwierigkeiten bei der heterologen Genexpression in *E. coli* nicht geklärt werden. Bioinformatische Analysen weisen allerdings darauf hin, dass es sich bei Mth61 um ein extrazelluläres Protein handelt, so dass es vielleicht ein Nebenfimbrin darstellt. Auch wenn von der mRNA-Menge, wie bereits erwähnt, nicht zwingend auf die Proteinmenge geschlossen werden kann, sei an dieser Stelle erwähnt, dass die mRNA-Menge von *mth61* verglichen mit *mth60* um den Faktor 5,8 niedriger ist.

Mth58 wird laut *in silico* Analysen einerseits als cytoplasmatisches Protein, andererseits als membrangebundenes Protein eingestuft, so dass es eventuell in irgendeiner Art und Weise an der Assemblierung der Mth60-Fimbrien beteiligt ist. Auch in diesem Fall müsste das Protein nicht in großen Mengen in der Zelle enthalten sein. Die qRT-PCR-Ergebnisse sprechen für eine 3,3-fach niedrigere mRNA-Menge verglichen mit *mth60*.

Mth59 ist in der Datenbank zwar als hypothetisches Protein annotiert, jedoch gelang es in dieser Arbeit zu zeigen, dass es sich aller Wahrscheinlichkeit nach um ein Chaperon handelt. Dieses weist Ähnlichkeiten zu den bakteriellen Chaperonen auf, die an der Assemblierung adhäsiver Zellanhänge beteiligt sind (siehe IV.4). Im Vergleich zu den *mth61*-, *mth60*- und *mth58*-mRNAs ist die Transkriptmenge dieses Gens am niedrigsten (7,3-fach niedriger als *mth60*). Dies passt zu der vermeintlichen Funktion von Mth59. Zwar gibt es in der Literatur keine Angaben dazu, in welchen Mengenverhältnissen die Chaperone FimC bzw. PapD in der Zelle vorhanden sind, jedoch ist von einer relativ geringen Anzahl auszugehen, bedenkt man, dass die periplasmatischen Proteine, wie in Kap. I erwähnt, nach „Entlassung“ eines Pilins zur Bindung neuer Pilus-Untereinheiten zur Verfügung stehen.

Es ist zu betonen, dass die hier dargestellten qRT-PCR-Ergebnisse aus Versuchen mit RNA aus der stationären Wachstumsphase stammen. In dieser Phase befinden sich an der Zelloberfläche von *M. thermoautotrophicus* Fimbrien. Vermutlich beginnt die Assemblierung der Fimbrien in der exponentiellen Wachstumsphase, weswegen es als möglich erscheint, dass die Analyse der entsprechenden RNA abweichende Ergebnisse geliefert hätte. Dabei könnte es sich um eine verstärkte Expression der Gene handeln, die an der Initiierung der Fimbrienassemblierung beteiligt sind. Ähnliche Ergebnisse konnten zum Beispiel für die Flagellen von *Pyrococcus furiosus* erzielt werden. Hier wurde qualitativ über RT-PCR gezeigt, dass die Zellen abhängig von der Wachstumsphase unterschiedliche (Co-)Transkripte synthetisieren (Näther, 2007).

Da *M. thermoautotrophicus* bei Wachstum auf Oberflächen eine deutlich größere Zahl an Fimbrien ausbildet, ist anzunehmen, dass die Expression der Zellanhänge durch Grenzflächen induziert wird. Die hier dargestellten Daten beziehen sich auf planktonisch gewachsene Zellen. Es ist demnach denkbar, dass in adhärenenten Zellen eine abweichende (Co-)Transkription der Fimbrien-spezifischen Gene zu verzeichnen wäre.

Auch wenn *mth382* und *mth383*, die bereits aufgrund ihrer Ähnlichkeiten zu *mth60* genannt wurden (siehe Kap. I), weit von den „*mth60*-Operons“ entfernt liegen, so ist es dennoch möglich, dass auch diese Gene an der Assemblierung der Mth60-Fimbrien von *M. thermoautotrophicus* beteiligt sind und ihre Expression mit den beiden anderen Transkriptionseinheiten co-reguliert wird. Für zukünftige Arbeiten wäre es interessant zu überprüfen, ob auch *mth382* und *mth383* gemeinsam transkribiert werden und welche Funktion sie bei der Assemblierung der Fimbrien einnehmen. Aufgrund der Ähnlichkeit zum Hauptfimbrin Mth60 wäre es denkbar, dass sie Nebenfimbrine darstellen. So sind zum Beispiel auch die fünf Flagellengene von *H. salinarum* auf zwei Transkriptionseinheiten verteilt, die im Genom weit voneinander entfernt lokalisiert sind (Gerl & Sumper, 1988).

2 Charakterisierung der Mth60-Fimbrien von *M. thermoautotrophicus*

2.1 Isolierung der Mth60-Fimbrien

In der Vergangenheit sind die Mth60-Fimbrien von *M. thermoautotrophicus* dadurch gewonnen worden, dass sie von geernteten Zellen mechanisch mittels Ultra-Turrax abgeschert wurden. Auf diese Weise konnten aus einem 100 Liter Fermenter lediglich 10 µg Fimbrien isoliert werden (Thoma *et al.*, 2008), was zur Vermutung führte, dass die 5 nm dünnen Fimbrien bei der Zentrifugation abgeschert worden waren und sich größtenteils im Kulturüberstand befanden. Dieses Phänomen wurde bereits für die 14 nm dicken Fibers von *Ignicoccus hospitalis* beschrieben, die deswegen über PEG/NaCl-Fällung aus dem Überstand angereichert wurden. Die starke Empfindlichkeit der Fibers zeigte sich ferner dadurch, dass *I. hospitalis*-Zellen, die der Kultur mithilfe einer Kanüle und Spritze entnommen worden waren, keine Zellanhänge mehr besaßen (Müller *et al.*, 2009).

Bei dem Versuch zur Fimbrienisolierung aus dem Zentrifugationsüberstand bestätigte sich auch die Sensitivität der Zellanhänge von *M. thermoautotrophicus*: So konnte aus dem Überstand eines 100 Liter Fermenters mit insgesamt 1,6 mg Fimbrien eine etwa 1000-fach höhere Ausbeute als mit der Ultra-Turrax-Behandlung erzielt werden. Der Erfolg dieses neuen Vorgehens ist dabei noch höher anzusehen, da in dieser Arbeit mit dem Typstamm DeltaH und nicht – wie bisher – mit dem Isolat AG5 gearbeitet wurde. Vergleichende Untersuchungen von Christine Thoma (2005) hatten gezeigt, dass die Zellen des Stammes AG5 eine etwa zehnfach höhere Anzahl an Fimbrien ausbilden. Dies erklärt auch, warum im Zuge dieser Arbeit bei Anwendung der Ultra-Turrax-Methode an *M. thermoautotrophicus* DeltaH-Zellen keine nachweisbare Menge an Fimbrien isoliert werden konnte.

Zusätzlich zur Möglichkeit, die abgebrochenen Fimbrien aus dem Medium zu fällen, wurde auch das Potential erkannt, die Fimbrien(fragmente), die nach der Zentrifugation noch zellassoziiert vorlagen, durch eine enzymatische Auflösung der Zellwand anzureichern. Die 16,5 nm dicke Pseudomureinschicht von *M. thermoautotrophicus* (Zeikus & Wolfe, 1973) wurde hierfür mit dem Enzym Pseudomurein-Endoisopeptidase (PeiP; Luo *et al.*, 2002) zerstört, woraufhin die Fimbrien freigesetzt wurden. Diese Tatsache lässt darauf schließen, dass die Fimbrien (ausschließlich) in der Zellwand verankert sind, womit sich Parallelen zu den Fimbrien bzw. Pili Gram-positiver Bakterien ergeben. Diese Bakterien haben einen zu *M. thermoautotrophicus* analogen Zellaufbau bestehend aus Cytoplasmamembran und aufgelaagerter, dicker Mureinschicht. Auch wenn der Assemblierungsmechanismus dieser Pili und Fimbrien noch nicht vollständig geklärt ist, so wird stark davon ausgegangen, dass sie, genauso wie andere Oberflächenproteine, in der Mureinschicht verankert sind. Dabei handelt es sich um eine kovalente Verknüpfung in Form einer Amidbindung zwischen der C-terminalen COOH-Gruppe der Piline und einer Aminogruppe des Peptidoglykans (Ton-That & Schneewind, 2003). Diese Bindung wird durch eine Transpeptidase (Sortase) katalysiert (Mandlik *et al.*, 2008). Ähnlich zu *M. thermoautotrophicus* werden auch die Pili Gram-positiver Bakterien über Behandlung mit einer Mureinhydrolase freigesetzt (Ton-That & Schneewind, 2003).

Diese neu etablierte Methode zur Isolierung der Fimbrien von *M. thermoautotrophicus* (wie auch *M. marburgensis*, siehe IV.2.4) bietet in Zukunft die Möglichkeit, die Verankerungsstrukturen der Fimbrien zu studieren. Zu diesem Zweck muss die PeiP-Behandlung noch weiter optimiert werden, da sie zumindest im Fall von *M. thermoautotrophicus* keine reinen Fimbrienfraktionen lieferte. Hierzu müssten die Fimbrien künftig vermutlich mehreren CsCl-Dichtegradientenzentrifugationen unterzogen werden.

2.2 Elektronenmikroskopische Analyse der Mth60-Fimbrien

2.2.1 Ultrastruktur

Die über PEG-Fällung gewonnenen und mittels CsCl-Dichtegradientenzentrifugation aufgereinigten Fimbrien von *M. thermoautotrophicus* erschienen im TEM sauber, lang und gut strukturiert. Dennoch scheiterten die Versuche, im Power-Spektrum der maskierten, Uranylacetat-kontrastierten Fimbrien spezifische Reflexe zu erkennen, die Hinweise auf die dreidimensionale Struktur gegeben hätten. Ähnliche Ergebnisse lieferte bereits eine Tomographie von vier nebeneinander liegenden Mth60-Fimbrien (Thoma, 2005). Jedoch waren die hierbei verwendeten Zellanhänge zuvor bereits mindestens einem Einfrier-/Auftauzyklus unterzogen worden, wodurch sie möglicherweise geschädigt worden waren. Trotz dieser Daten, die auf keine symmetrische Anordnung der Fimbrien-Untereinheiten schließen lassen, ist aber davon auszugehen, dass die Fimbrien von *M. thermoautotrophicus*, ähnlich wie andere Zellanhänge, ebenfalls aus periodischen Wiederholungen einander identischer Untereinheiten aufgebaut sind. So konnten bisher Symmetrien für verschiedene

archaeelle (Cohen-Krausz & Trachtenberg, 2008; Trachtenberg *et al.*, 2005) und bakterielle Flagellen (Morgan *et al.*, 1995), für die Fibers von *I. hospitalis* (Yu *et al.*, 2012), die Hami vom SM1-Euryarchaeum (Moissl *et al.*, 2005), sowie für bakterielle (Mu *et al.*, 2002; Craig *et al.*, 2006; Wang *et al.*, 2009) und archaeelle Fimbrien bzw. Pili (Wang *et al.*, 2008; Henche *et al.*, 2012) ausgemacht werden.

Es ist davon auszugehen, dass der Misserfolg bei der Bestimmung einer Periodizität der Fimbrien von *M. thermoautotrophicus* in erster Linie durch die Präparation bedingt ist. So wurden die Fimbrien dehydratisiert und anschließend einer Schwermetallkontrastierung unterzogen. Eine weitaus vielversprechendere Methode stellt die Cryo-Elektronenmikroskopie dar, bei der gefrorene, hydratisierte und unkontrastierte Fimbrien untersucht werden können. Der Unterschied zwischen beiden Methoden bei der Rekonstruktion von Zellanhängen konnte an den Fibers von *I. hospitalis* gezeigt werden (Meyer, 2010).

2.2.2 Dünnere Filamente

Zusätzlich zu den 5 nm dicken Fimbrien konnten im TEM auch wenige dünnere Filamente mit einem Durchmesser von etwa 2 nm beobachtet werden. Von diesen Filamenten wurde bereits in vergangenen Arbeiten im Zuge der Mth60-Fimbrien-Isolierung über Ultra-Turrax berichtet (Thoma, 2005; Schmid, 2009). Es ist denkbar, dass es sich dabei um Untereinheiten der Fimbrien handelt, die zu mehreren zusammengesetzt ein 5 nm dickes Fimbrium ergeben. Ein solcher Aufbau ist vorwiegend von bakteriellen Flagellen bekannt, deren Filamente in der Regel aus elf sogenannten Protofilamenten bestehen (Yonekura *et al.*, 2003). Ebenfalls aus mehreren dünnen Filamenten aufgebaut sind die Hami des SM1-Euryarchaeums (Moissl *et al.*, 2005).

Möglich wäre auch, dass die Fimbrien aus nur einem 2 nm dünnem Filament bestehen, das helikal aufgewunden ist. Dieser Aufbau würde dem der Typ 1- bzw. Pap-Pili von *E. coli* gleichen (vgl. Abb. I.3). Hierbei windet sich das helikale Filament erst an der Zelloberfläche auf, da die vom Usher in der äußeren Membran gebildete Pore lediglich 2-3 nm breit ist (Thanassi *et al.*, 1998; Saulino *et al.*, 2000). Obwohl *M. thermoautotrophicus* keine äußere Membran aufweist, wäre es möglich, dass der Pilus die Pseudomureinschicht im fadenförmigen Zustand passiert und erst an der Zelloberfläche eine helikale Struktur annimmt. Unter diesen Umständen könnte es sich bei den 2 nm Filamenten um Fimbrien handeln, deren finale Struktur sich entweder nicht ausgebildet oder aber wieder aufgelöst hat. Zur Be- bzw. Entkräftigung dieser Theorien müsste die Ultrastruktur der Fimbrien unter den bereits diskutierten, verbesserten Bedingungen analysiert werden.

Eine weitere Erklärung wäre, dass es sich bei den dünnen Filamenten um eine zweite Art von Zellanhängen handelt, die in geringerer Zahl oder unter anderen Bedingungen als die Fimbrien exprimiert werden. Allerdings muss hierbei bedacht werden, dass die 2 nm dünnen Filamente in Fimbrienfraktionen gefunden wurden, die über einen isopyknischen Dichtegradienten aufgereinigt worden waren. Dies lässt die Wahrscheinlichkeit, dass es sich um

andersartige Strukturen handelt, gering erscheinen, hätten diese vermutlich eine von den Mth60-Fimbrien abweichende Dichte.

2.2.3 Endständige Strukturen

An manchen Enden der über PEG-Fällung angereicherten Mth60-Fimbrien konnten etwa 20 nm dicke, knopfartige Strukturen beobachtet werden. Auch bei diesen endständigen Strukturen handelt es sich um ein bereits bekanntes Phänomen (Thoma, 2005; Schmid, 2009). Trotzdem ist unklar, ob die „Knöpfe“ potentielle Verankerungsstrukturen der Fimbrien in der Zellwand darstellen, oder ob sie am zellfernen Ende der Fimbrien lokalisiert sind. Letzteres erscheint unwahrscheinlich, da weder bei *M. thermoautotrophicus* noch bei anderen Archaeen von solchen Strukturen an den distalen Enden der Fimbrien berichtet wurde. Wahrscheinlicher ist es, dass es sich dabei um Verankerungsstrukturen handelt. Zwar sind bislang keine Daten zu potentiellen Verankerungsstrukturen archaeeller Fimbrien und Pili bekannt, jedoch weisen einige archaeelle Flagellen ähnliche knopfartige Basalstrukturen auf (Kalmokoff *et al.*, 1988; Kupper *et al.*, 1994; Bardy *et al.*, 2002).

Da die Fimbrien aus dem Zentrifugationsüberstand gefällt wurden, würde das bedeuten, dass sie mitsamt ihrer Verankerung aus der Zellwand herausgelöst wurden, was unwahrscheinlich erscheint. Bedenkt man jedoch, dass die Zellanhänge aus spät stationären Kulturen isoliert wurden, so ist es möglich, dass sich manche Zellen bereits in Lyse befanden und somit ein paar verankerte Fimbrien freigesetzt wurden.

Die Versuche, die Lokalisation der knopfartigen Strukturen durch elektronenmikroskopische Analysen zu klären, misslangen. Hierbei sollten im TEM und REM die distalen Enden der Fimbrien adhärent gewachsener Zellen näher untersucht werden. Rasterelektronenmikroskopische Präparate von *M. thermoautotrophicus* waren aufgrund eines auch für Prof. Wanner unerklärbaren „Schleiers“, der das Präparat überdeckte, nicht auswertbar. Im TEM zeigte sich die Problematik, dass keine zellassoziierten Fimbrien auf den kohlebeschichteten Gold-Grids gefunden werden konnten. Trotz fehlender Zentrifugations- bzw. Pipettierschritte und größtmöglicher Vorsicht wurden die Fimbrien während der Präparation geschädigt. Dies weist erneut auf ihre Empfindlichkeit hin.

Auf dem Kohlefilm selbst waren zwar ein paar „freie“ Fimbrien zu finden, allerdings konnten keine knopfartigen Strukturen ausgemacht werden. Dies mag an der geringeren Anzahl der untersuchten Fimbrien liegen: Während die Zellanhänge nach Isolierung und Aufreinigung hochkonzentriert auf das Grid aufgebracht wurden, konnten auf den Gold-Grids nur vereinzelt Fimbrien gefunden werden. Im Gegensatz zu den knopfartigen Strukturen wurden allerdings andere, endständige „Ausbuchtungen“, die an Haken bzw. Golfschläger erinnerten, beobachtet. Auch in diesem Fall ist keine Aussage über Lokalisation und Funktion möglich, allerdings wäre ebenfalls denkbar, dass diese Strukturen (Teile von) Verankerungen darstellen. Einen Hinweis darauf lieferten die über PeiP-Behandlung isolierten Fimbrien von *M. marburgensis*, einem sehr nahen Verwandten von *M. thermoautotrophicus*. Hierbei

wurden zahlreiche endständige und „gewundene“ Strukturen gefunden, die bei einer Isolierung der Fimbrien mit PEG nicht auftraten. Zwar konnten über eine analoge PeiP-Behandlung keine sauberen *M. thermoautotrophicus*-Fimbrien gewonnen werden, jedoch wäre es denkbar, dass es sich bei den „Ausbuchtungen“ um Teilstücke der bei *M. marburgensis* beobachteten Strukturen handelt. Für die Zukunft muss die Isolierung der Fimbrien über PeiP optimiert werden, da dies zur Aufklärung der Verankerungsstruktur beitragen könnte.

Eine sehr gute Möglichkeit, um einen Einblick in Verankerungsstrukturen und deren subzelluläre Lage zu erhalten, stellen Ultradünnschnitte dar. Für die Fibers von *I. hospitalis* gelang es auf diese Weise, eine runde bzw. kugelförmige Struktur als potentielle Ankerstruktur ausfindig zu machen (Meyer, 2010). Diese Methode sollte auch für *M. thermoautotrophicus* überprüft werden, jedoch trat hier das Problem auf, dass die Zellen Cellulosekapillaren nur unzureichend als Aufwuchsoberflächen nutzten, so dass in den entsprechenden Ultradünnschnitten keine Zellen gefunden werden konnten. Die Kultivierung in Cellulosekapillaren hätte allerdings eine Fimbrien-schonende Präparationsmethode dargestellt, die es im Optimalfall ermöglicht hätte, ein Fimbrium an seinem Austrittspunkt aus der Zelle längs zu halbieren und auf diese Weise die Verankerungsstruktur zu visualisieren.

Eine kürzlich etablierte, schonende und bestenfalls auch Fimbrien-erhaltende Methode zur Aufkonzentrierung einer Kultur, die in Zukunft einer Zentrifugation vorzuziehen wäre, stellt die Filtration der Kultur mithilfe einer Membran dar (Thomas Heimerl, persönliche Mitteilung).

2.2.4 Immunmarkierungen mit Fimbrien-spezifischen Antikörpern

Die isolierten Mth60-Fimbrien konnten erfolgreich und spezifisch mit den gegen sie generierten Antikörpern markiert werden. Dabei zeigte sich eine gleichmäßige Verteilung der Antikörper über die gesamte Länge der Fimbrien, unabhängig davon, ob diese im Vorfeld der Markierung hitzedenaturiert wurden, oder nicht. Anscheinend weisen die Fimbrien also auch ohne den Hitzeschritt genügend freie Epitope auf ihrer Oberfläche auf.

Fanden die Markierungen an bewachsenen Gold-Grids statt, so fiel auf, dass nicht nur der Bereich der Zellpole, sondern die gesamte Zelloberfläche von *M. thermoautotrophicus* markiert worden war. Immunmarkierungen an Ultradünnschnitten zeigten, wie erwartet, dass das Hauptfimbrium Mth60, gegen das die Antikörper in erster Linie gerichtet waren, fast ausschließlich im Randbereich der Zellen lokalisiert ist. Zwar trat eine verstärkte Markierung an den Zellpolen auf, jedoch wurde auch hier deutlich, dass die Markierung entlang der gesamten Zelle stattgefunden hatte. Dieses Ergebnis wirft Fragen auf, da *M. thermoautotrophicus* Fimbrien hauptsächlich an den Zellpolen ausbildet. Eine Erklärung wäre, dass die Fimbrien, die zur Herstellung der Antikörper verwendet wurden, mit geringen Mengen an Zellwand-Fragmenten verunreinigt waren, so dass sich die Antikörper auch hiergegen richteten. Andererseits erscheint es auch möglich, dass Mth60 nicht nur Teil der Fimbrien ist, sondern auch als einzelnes Adhäsion auf der Zelloberfläche exponiert wird. Von pathogenen

Gram-positiven Bakterien sind zahlreiche adhäsive Proteine bekannt, die der Gruppe der MSCRAMMs (*m*icrobial *s*urface *c*omponents *r*ecognizing *a*dhesive *m*atrix *m*olecules) angehören. Diese Proteine sind im Murein verankert und ermöglichen den Zellen im Zuge der Kolonisierung der Wirtszelle die Bindung an Fibronektin, Fibrinogen, Kollagen und Heparin (Patti, 1994). Für die oben aufgestellte Hypothese spricht auch das kürzlich veröffentlichte Beispiel von *Corynebacterium diphtheriae*: Dieser Organismus bildet an seiner Oberfläche adhäsive SpaA-Pili aus, an deren Aufbau auch die Nebenpiline SpaB und SpaC beteiligt sind. Die beiden Letztgenannten können jedoch auch ohne das Hauptpilin SpaA miteinander interagieren und als Heterodimere an der Zelloberfläche exponiert werden. Wie auch im SpaA-Pilus wirken die Nebenpiline als Adhäsine (Chang *et al.*, 2011).

2.2.5 „Leiterähnliche“ Strukturen

Obwohl über diese Strukturen und ihren möglichen Zusammenhang mit den Mth60-Fimbrien nur spekuliert werden kann, sollen sie an dieser Stelle kurz diskutiert werden:

An den Zellpolen von adhärent gewachsenen *M. thermoautotrophicus*-Zellen konnten in manchen Fällen einzigartige, 13 bis 14 nm im Durchmesser betragende Strukturen ausgemacht werden, deren Erscheinungsbild im TEM an „Leitern“ erinnerte. Solche Strukturen wurden weder zuvor beschrieben, noch konnten sie im Laufe der Fimbrienisolierung in einer Fraktion des CsCl-Dichtegradienten beobachtet werden. Da sie wiederholt gefunden wurden und zum Teil ersichtlich war, dass sie der Zelle entspringen, ist nicht von Artefakten auszugehen. Immunmarkierungen mit Antikörpern, die gegen die Fimbrien von *M. thermoautotrophicus* und damit in erster Linie gegen das Hauptfimbrin Mth60 gerichtet waren, verliefen negativ, so dass davon auszugehen ist, dass dieses Protein kein (Haupt-) Bestandteil der „leiterähnlichen“ Strukturen ist.

Eine mögliche Funktion dieser Strukturen als stabilisierende, Fimbrien umgebende Scheide kann höchstwahrscheinlich ausgeschlossen werden, da bisher erstellte TEM-Aufnahmen von *M. thermoautotrophicus* keinerlei Umhüllung der entspringenden Fimbrien erkennen ließen (Thoma, 2005; Schmid, 2009). Zudem sind solche Scheiden, die als *flagellar sheaths* bezeichnet werden und bei einigen bakteriellen Flagellen vorkommen, aus Membranen aufgebaut und stellen Ausstülpungen der Zellhüllen dar (Sjölblad *et al.*, 1983).

Es wäre denkbar, dass es sich bei den „leiterähnlichen“ Strukturen um eine weitere Form von Zellanhängen handelt. Da diese nur nach adhärentem Wachstum beobachtet wurden, könnte ihre Expression durch Oberflächen induziert werden, so dass sie, wie die Fimbrien, ebenfalls zur Adhäsion dienen. Allerdings schienen die neuartigen Strukturen ähnlich empfindlich wie die Mth60-Fimbrien zu sein, so dass dies möglicherweise der Grund ist, weswegen sie noch nicht an planktonisch gewachsenen Zellen gefunden werden konnten. Interessant wären die Klärung der dreidimensionalen Struktur der „leiterähnlichen“ Zellfortsätze und die Frage, ob sie innen hohl sind. In diesem Fall könnten sie zum Beispiel an der Exkretion bestimmter Substanzen beteiligt sein.

2.3 Versuche zur Identifizierung der Fimbrien-Proteine

Bislang ist Mth60 das einzige bekannte Protein der Fimbrien von *M. thermoautotrophicus*, wobei es mit einem Anteil von etwa 95 % (Prof. R. Wirth, persönliche Mitteilung) das Hauptfimbriin darstellt. Da im Rahmen dieser Arbeit erstmals eine verhältnismäßig große Menge an Fimbrien gewonnen wurde, sollten diese auf weitere Proteine hin untersucht werden. Im SDS-Gel wurden neben dem dominierenden Mth60 tatsächlich noch weitere, schwache Banden bei etwa 17, 19 und 27 kDa sichtbar. Da die eingesetzten Fimbrien einen hohen Reinheitsgrad aufwiesen, könnte es sich dabei um Nebenfimbrine oder um jene Proteine handeln, die die endständigen Strukturen ausbilden.

Sämtliche Versuche zur Identifizierung dieser Proteine scheiterten. MALDI-TOF-Analysen lieferten nach dem in-Gel-Verdau mittels Trypsin, Chymotrypsin bzw. Endoproteinase Glu-C keine Ergebnisse. Ein Grund hierfür könnte die geringe Größe der zu untersuchenden Proteine sein, da kürzere Aminosäuresequenzen auch weniger potentielle Spaltstellen für Proteasen aufweisen. Als weitere Problematik ist die Herkunft der Proteine zu nennen. Die aus thermophilen Organismen stammenden Proteine sind in verschiedener Hinsicht an die hohen Temperaturen angepasst, wobei eine dieser Adaptationen eine deutlich kompaktere Struktur darstellt (Jaenicke & Böhm, 1998). Es ist denkbar, dass die Proteine trotz der vorangegangenen Behandlung nur unzureichend denaturiert worden waren und den Proteasen damit keine Angriffspunkte boten.

Nach Inkubation bei 80°C und Trypsin-Verdau der Fimbrien in Lösung zeigte die gelelektrophoretische Kontrolle der Probe den Erfolg der Proteolyse auf. Dennoch konnten über LC/MS kaum Proteine mit signifikantem Score-Wert bestimmt werden. Dies lag vermutlich ebenfalls an der geringen Molekularmasse der Proteine, da der Score-Wert mit der Anzahl der identifizierten Peptide korreliert. Neben Mth60 wurden lediglich wenige Proteine von *M. thermoautotrophicus* identifiziert, wobei es sich bei denen im interessanten Größenbereich zwischen 15 und 30 kDa um hypothetische Proteine handelte, die im Genom weit von Mth60 entfernt lokalisiert sind. Die vom Programm ProtParam vorausgesagten molekularen Massen von Mth58, Mth59 und Mth61 würden ca. 12, 21 und 19 kDa betragen.

Vor allem die Zellanhänge (hyper-)thermophiler Organismen weisen aufgrund ihrer nach außen exponierten Lage hohe Stabilitäten auf. So führen weder Phenol noch Detergenzien zur Dissoziation der Aap-Pili von *Sulfolobus acidocaldarius* (Henche *et al.*, 2012). Im Fall der Cannulae von *Pyrodicticum occultum* bewirkt eine Temperatur von bis zu 135°C keinerlei Strukturveränderung (Nickell *et al.*, 2003). Auch für *M. thermoautotrophicus* wurden bereits erfolglose Versuche zur Depolymerisation der Fimbrien über den Einsatz von Detergenzien, reduzierenden und chaotropen Agenzien durchgeführt (Frank, 2006). Das zukünftige Vorgehen zur Proteolyse der Fimbrien könnte darin bestehen, die Proteine zunächst mit der unspezifischen Protease Papain zu inkubieren, um so Erkennungssequenzen für Trypsin freizulegen (Prof. R. Deutzmann, persönliche Mitteilung). Eine weitere Methode, die auch an

den Mth60-Fimbrien überprüft werden kann, wurde für *Pyrococcus furiosus* berichtet. Dabei wurden die Proteine im Vorfeld des Trypsin-Verdaus einer saueren Hydrolyse in der Mikrowelle unterzogen (Lee *et al.*, 2009).

2.4 Vergleich der Mth60-Fimbrien mit den Fimbrien verwandter Methanogener

Methanothermobacter marburgensis wurde erst im Jahr 2000 im Zuge der Untersuchung der Verwandtschaftsbeziehungen innerhalb der Gattung *Methanobacterium* als neue Art identifiziert und wurde bis zu diesem Zeitpunkt unter der Bezeichnung *Methanobacterium thermoautotrophicum* (heute *M. thermoautotrophicus*) strain Marburg geführt (Wasserfallen *et al.*, 2000). Da das Gesamtgenom von *M. marburgensis* vor Kurzem sequenziert wurde (Liesegang *et al.*, 2010), war die nähere Untersuchung der Fimbrien und vor allem die Prüfung auf Homologien zu den Mth60-Fimbrien von *M. thermoautotrophicus* von besonders großem Interesse.

Die Fimbrien von *M. marburgensis* konnten aus einem kleinen Kulturvolumen (2,5 Liter) sowohl über PEG-Fällung als auch PeiP-Behandlung angereichert werden. Im TEM glichen sie den Fimbrien von *M. thermoautotrophicus* und wiesen zum Teil ebenfalls endständige, knopfartige Strukturen auf, die mit einem Durchmesser von bis zu 40 nm jedoch ungefähr doppelt so groß erschienen. Während diese knopfartigen Strukturen bei den mit PEG gefällten Fimbrien zu beobachten waren, zeigten die aus der Pseudomureinschicht herausgelösten Fimbrien zahlreiche „gewundene“ Strukturen. Dabei handelte es sich höchstwahrscheinlich um jene Enden der Fimbrien, die in der Zellwand lokalisiert sind. Überraschend waren allerdings die Maße dieser Strukturen mit etwa 100 x 40 nm. Unter Annahme einer ähnlich dicken Pseudomureinschicht wie bei *M. thermoautotrophicus* (16,5 nm; Zeikus & Wolfe, 1973) oder dem kürzlich charakterisierten *Methanothermobacter tenebrarum* (21 nm; Nakamura *et al.*, im Druck) erscheint es jedoch unwahrscheinlich, dass sich diese „gewundenen“ Strukturen ausschließlich in der Zellwand befinden.

Die gewonnenen Fimbrien wiesen eine molekulare Masse von etwa 14 kDa auf und unterschieden sich dadurch von dem 16 kDa-Protein Mth60. Zudem wurden sie im Western Blot sowie über Immunmarkierungen an Suspensionspräparaten negativ auf eine Kreuzreaktion mit den Antikörpern gegen die Mth60-Fimbrien getestet. Dieses Ergebnis wurde durch bioinformatische Analysen bestätigt: Die gezielte Suche nach Mth60-homologen Proteinen in *M. marburgensis* lieferte zwar Ähnlichkeiten zu Mtbma_c07830 und Mtbma_c07820, jedoch zeigten weitere Alignments, dass diese Proteine eine weitaus größere Ähnlichkeit zu Mth382 und Mth383 aufweisen. Demnach scheinen sich in *M. marburgensis* und *M. thermoautotrophicus*, trotz der nahen Verwandtschaft, verschiedene Fimbrien entwickelt zu haben. Dass die (Haupt-)Fimbrine dabei keine bzw. nur geringe Ähnlichkeiten zueinander aufweisen, ist schwierig zu erklären. Zwar müssen sich Mikroorganismen bei der Besiedelung von ökologischen Nischen anpassen, allerdings wurden beide Organismen aus Klärschlamm isoliert. Zudem ist zum Beispiel auch von den

Flagellinen verschiedener Archaeen bekannt, dass sie deutliche Ähnlichkeiten zueinander aufweisen. Dies wurde an den *Methanococcus*-Arten *M. maripaludis*, *M. deltae*, *M. vannieli* und *M. voltae* über Immunoblot gezeigt (Kalmokoff *et al.*, 1992) und anhand von Aminosäuresequenzvergleiche bestätigt: Die Flagelline weisen alle einen konservierten, N-terminalen Bereich auf (Thomas & Jarrell, 2001).

Da die Genomsequenz, wie bereits erwähnt, bekannt ist, wurde versucht, das Hauptfimbrin über MALDI-TOF MS/MS zu identifizieren. Dies scheiterte vermutlich aus ähnlichen Gründen wie bei *M. thermoautotrophicus* (vgl. IV.2.3)

Angesichts dieses Ergebnisses erscheint es nicht verwunderlich, dass offensichtlich auch den Fimbrienproteinen von *Methanothermus fervidus* Homologien zu Mth60 fehlen. So konnten im kürzlich veröffentlichten Genom (Anderson *et al.*, 2010) keine Ähnlichkeiten zu dem Hauptfimbrin von *M. thermoautotrophicus* gefunden werden. Annotierte Genomsequenzen können zwar, wie für *P. furiosus* gezeigt wurde (Näther, 2007), zum Teil gravierende Fehler aufweisen, jedoch ist hier aufgrund der für *M. marburgensis* erhaltenen Ergebnisse eher nicht mit einem solchen Fehler zu rechnen.

Bei den schwachen Kreuzreaktionen, die im Western Blot mit dem anti-Mth60-Fimbrien Antikörper detektiert wurden, handelt es sich höchstwahrscheinlich um unspezifische Bindungen. Grund für diese Annahme ist, dass die hierbei verwendete Fraktion des CsCl-Gradienten nur verhältnismäßig wenig Fimbrien und dafür zahlreiche Zellen und somit große Mengen an Proteinen enthielt. Im Gegensatz dazu zeigte sich bei der sauberen Fimbrienfraktion keine Kreuzreaktion. Allerdings muss erwähnt werden, dass die Konzentration der Fimbrien hierbei so niedrig war, dass diese auch im silbergefärbten Gel nicht detektiert werden konnten. Demzufolge ließ sich auch keine Aussage über die molekulare Masse des (Haupt-)Fimbrins von *M. fervidus* treffen. Basierend auf der geringen Fimbrienmenge konnten zur Identifizierung der Fimbrienproteine lediglich LC/MS-Analysen durchgeführt werden, die jedoch ebenfalls ohne Ergebnisse blieben.

Dass bei der Aufreinigung der Fimbrien von *M. fervidus* nur sehr geringe Ausbeuten erzielt werden können, wurde bereits nach Anwendung der Ultra-Turrax-Methode beschrieben (Thoma, 2005). Aus diesem Grund wurde für die Fimbrien-Isolierung über PEG-Fällung und PeiP-Behandlung ein größeres Kulturvolumen von 4 Litern gewählt. Allerdings musste bereits im Vorfeld an einem Erfolg der PeiP-Behandlung gezweifelt werden, da der Pseudomureinschicht von *M. fervidus* ein S-Layer aus Glykoproteinen aufgelagert ist (Whitman *et al.*, 2006). Dieser S-Layer hat eine hexagonale Gitterstruktur (p6-Symmetrie) und zeichnet sich durch einen Center-to-Center-Abstand von 20 nm aus (Claus & König, 2010). Die äußerst geringe Fimbrienausbeute lässt darauf schließen, dass der S-Layer die Passage des 38 kDa-Proteins PeiP tatsächlich behindert. Die Poren, die sich in einem S-Layer aufgrund der spezifischen Anordnung der einzelnen (Glyko-)Proteine ergeben, haben einen durchschnittlichen Durchmesser von 2 bis 8 nm (Sára & Sleytr, 2000) und erlauben einen selekti-

ven Durchtritt von Molekülen. Auf diese Weise wirken S-Layer als molekulare Siebe. So wurde für *Bacillus stearothermophilus* von einer Molekülausschlussgrenze zwischen 30 und 45 kDa berichtet, was laut den Autoren auf einen Porendurchmesser von etwa 4,5 nm schließen lässt (Sára & Sleytr, 1987).

Auch über PEG-Fällung konnten kaum Fimbrien angereichert werden, obwohl TEM-Analysen gezeigt hatten, dass etwa 30 % der Zellen Fimbrien auf ihrer Oberfläche ausbilden (Thoma, 2005). Sofern diese Angaben stimmen, wäre es möglich, dass die Fimbrien von *M. fervidus* stabiler sind und während der Zentrifugation nicht so leicht abgeschert werden.

Die gewonnenen Fimbrien hatten einen Durchmesser von 5 nm, wodurch erneut (Thoma, 2005; Held, 2006) gezeigt wurde, dass der als flagelliert beschriebene Organismus (Jarrell *et al.*, 1996; Kalmokoff *et al.*, 1992) Fimbrien ausbildet. Endständige Strukturen konnten an den Fimbrien von *M. fervidus* nicht beobachtet werden.

3 Heterologe Genexpression in *E. coli*

Für diese Arbeit war es essentiell, vor allem die Proteine Mth60 und Mth59 rekombinant zu erstellen. Dabei war bereits aus vorangegangenen Arbeiten bekannt, dass sich die heterologe Genexpression archaeeller Gene in *E. coli* schwierig gestalten kann. Dies zeigte sich zum Beispiel bei den Flagellinen von *P. furiosus* (Dietl, 2006; Schopf, 2011).

Ähnlich schlechte Ergebnisse lieferte die Expression des auf *E. coli* toxisch wirkenden Hauptfimbrins *mth60* (Frank, 2006). Das Gen konnte aufgrund einer herbeigeführten Lyse des Wirtsorganismus nicht alleine, sondern nur im Impact-System (*Intein mediated purification with an affinity chitin-binding tag*) als Fusionsprotein, bestehend aus dem Zielprotein, Intein und einer Chitin-bindenden Domäne, exprimiert werden. Nach der Aufreinigung über Affinitätschromatographie stellte sich jedoch heraus, dass das eluierte Protein mit dem Hitzeschockprotein HspA von *E. coli* assoziiert war. Dies war ein weiterer Beweis dafür, dass das rekombinante Mth60 für *E. coli* Stress bedeutet. Aufgrund der Komplexierung des rekombinanten Proteins war dieses jedoch nicht mehr frei in der Zelle verfügbar und damit vermutlich auch weniger toxisch für *E. coli* (Frank, 2006).

Basierend auf diesen Ergebnissen wurde zur Expression von *mth60* ein künstliches Genkonstrukt kloniert, das zusätzlich die Sequenz für das vermeintliche Chaperon *mth59* enthielt. Dieses sollte in *E. coli* an das Hauptfimbrin Mth60 binden und auf diese Weise die toxischen Eigenschaften herabsetzen. Obwohl die gelelektrophoretische Kontrolle keine (deutliche) Expression von Mth59 erkennen ließ, war die Toxizität auf *E. coli* vermindert. Nach erfolgter Induktion war das Medium zwar leicht viskos, dennoch ließ sich rekombinantes Mth60 gewinnen, das in diesem Fall nicht mit HspA verunreinigt war.

Neben der Co-Expression von *mth59* wurde das Genkonstrukt dahingehend verändert, dass dessen Sequenz auf die *codon usage* von *E. coli* angepasst worden war. Dies sollte sicherstellen, dass die Translation nicht durch im Wirtsorganismus selten vorhandene tRNAs

erschwert wird. Ob der Grund für die herabgesetzte Toxizität von Mth60 in der Anwesenheit geringer Mengen Mth59 oder in der veränderten Gensequenz begründet lag, kann nicht mit Sicherheit gesagt werden. Allerdings deuten die Expressionen von *mth61* und *mth58* darauf hin, dass die *codon usage* eine untergeordnete Rolle spielt: In dieser Arbeit konnten die beiden Gene durch PCR-Amplifikation aus *M. thermoautotrophicus*-DNA und anschließender Klonierung unter keiner der getesteten Bedingungen erfolgreich exprimiert werden. Erste Induktionsversuche mit künstlichen, auf *E. coli* angepassten Einzelgensequenzen von *mth58* und *mth61* ließen ebenfalls keine Genexpression erkennen (Elke Papst, persönliche Mitteilung). Demnach ist der Erfolg bei der Expression des Genkonstruktes höchstwahrscheinlich auf geringe Mengen des Chaperons Mth59 zurückzuführen. Dieses ist vermutlich in der Lage, einen gewissen Teil des rekombinanten Mth60 zu binden und *E. coli* damit zu schützen. Über die positiven Auswirkungen auf die Genexpression durch Co-Expression von Chaperonen wurde bereits des Öfteren berichtet (Ikura *et al.*, 2002; Nishihara *et al.*, 2000; Schlieker *et al.*, 2002).

Bemerkenswert war die Erkenntnis, dass *E. coli* in der Lage war, Mth60 an genau der Stelle zu prozessieren, an der das Signalpeptid auch in *M. thermoautotrophicus* abgespalten wird. Dies erfolgte sogar dann, wenn das Signalpeptid durch die Sequenz eines His-Tags ersetzt worden war (Konstrukt II) und die Erkennungssequenz für die Peptidase demnach fehlte. Sowohl im Sec- als auch Tat-Transportsystem handelt es sich bei dieser Erkennungssequenz um das Motiv A-X-A[↓] in den Positionen -1 bis -3 relativ zur Schnittstelle, wobei X jede beliebige Aminosäure darstellt (Natale *et al.*, 2008). Während sich an diesen Positionen im Konstrukt I die Sequenz S-Y-A[↓] vorfindet, handelt es sich bei Konstrukt II um die Aminosäuren R-G-S[↓]. Dass Konstrukt I von *E. coli* tatsächlich, wie beobachtet, an der entsprechenden Stelle prozessiert werden kann, bestätigte das Programm SignalP (Daten nicht gezeigt). Auf Konstrukt II trifft dies jedoch nicht zu, weswegen auch keine Erklärung für die Spaltung des Proteins gegeben werden kann.

Signalpeptidasen sind im Zuge des Proteintransports aus dem Cytoplasma in das Periplasma tätig. Lichtmikroskopische Untersuchungen während der Genexpression ergaben allerdings, dass *E. coli* zahlreiche *inclusion bodies* gebildet hatte. Dabei handelt es sich um unlösliche Proteinaggregate, die bei der Expression von Fremdproteinen entstehen können, wenn diese nur unzureichend gefaltet sind (Kane & Hartley, 1988). Für eine solche intrazelluläre Lagerung spricht auch, dass das Protein ausschließlich aus der unlöslichen, cytosolischen Fraktion gewonnen werden konnte. Nach Passage der Cytoplasmamembran hätte sich das rekombinante Protein im Periplasma oder aber nach zusätzlichem Transport über die äußere Membran frei im Medium befinden müssen, was widerlegt wurde. Zur unlöslichen Fraktion werden neben *inclusion bodies* auch Membranproteine gezählt. Da nicht das gesamte Mth60 prozessiert wurde, wäre es möglich, dass ein Teil der Proteine in *inclusion bodies* und ein anderer Teil membrangebunden vorlagen.

Verglichen mit *mth58*, *mth60* und *mth61* ließ sich die über PCR amplifizierte Gensequenz von *mth59* problemlos in *E. coli* exprimieren. Dies ist nicht verwunderlich, weist Mth59 schließlich, wie unter IV.4 diskutiert, Ähnlichkeiten zu Chaperon-Proteinen von *E. coli* auf. Mth59 musste, genauso wie Mth60, unter denaturierenden Bedingungen mit 8 M Harnstoff aufgereinigt werden. Dass es nach Entfernung der denaturierenden Agenzien *in vitro* zu einer spontanen Rückfaltung der Proteine kommt und die native, dreidimensionale Struktur somit durch die Aminosäuresequenz des Proteins definiert ist, wurde bereits im Jahr 1973 gezeigt (Anfinsen, 1973). Nach entsprechender Dialyse konnten Mth59 und Mth60 erfolgreich in Co-Immunpräzipitationen (siehe IV.4) und Polymerisationsstudien (siehe IV.5) eingesetzt werden. Dies lässt einerseits darauf schließen, dass sich die Proteine korrekt renaturiert haben. Andererseits könnte es auch als Hinweis gewertet werden, dass Mth60 geringfügige Abweichungen vom nativen Protein zeigte, da Chaperone nur mit ungefalteten bzw. fehlerhaft gefalteten Proteinen interagieren (Walter & Buchner, 2002). Diese Abweichung könnte in dem nicht abspaltbaren C-terminalen His-Tag begründet sein.

Die Herstellung der rekombinanten Proteine Mth58 und Mth61 wird unumgänglich sein, um die Funktionen und Lokalisationen dieser Proteine zu klären. Für eine erfolgreiche Expression von *mth58* und *mth61* könnten in Zukunft weitere Induktionsbedingungen und *E. coli*-Expressionsstämme, sowie auch andere Wirtsorganismen herangezogen werden. Eine mögliche Alternative zu *E. coli* stellt zum Beispiel *Bacillus* dar. Der Vorteil dieses Gram-positiven Bakteriums liegt darin, dass rekombinant erzeugte Proteine in das Kulturmedium sekretiert werden können, wodurch toxische Wirkungen herabgesetzt werden (Westers *et al.*, 2004). Auch die Expression in einem Archaeum, wie zum Beispiel *P. furiosus* (Waage *et al.*, 2010), könnte in Zukunft in Betracht gezogen werden.

4 Mth59 und seine Funktion bei der Assemblierung der Mth60-Fimbrien

Bereits zu Beginn dieser Arbeit lagen aufgrund bioinformatischer Analysen Hinweise vor, dass es sich bei Mth59 um ein Chaperon handelt (Sarbu, 2009). Chaperone sind Proteine, die mit unvollständig oder falsch gefalteten Zielproteinen interagieren, ihnen zu einer korrekten Faltung verhelfen und auf diese Weise ihre Aggregation und ihren Abbau verhindern. Sie finden sich sowohl in Archaeen, Bakterien als auch Eukaryoten und werden in unterschiedliche Familien eingeteilt, wobei viele Chaperone sogenannte „Hitzeschockproteine“ sind, deren Expression unter Stressbedingungen induziert wird (Walter & Buchner, 2002). Eine weitere, besondere Art von Chaperonen ist im Periplasma Gram-negativer Bakterien lokalisiert und wird der PapD-Superfamilie zugeordnet. Die mehr als 30 bekannten PapD-ähnlichen Chaperone sind an der Assemblierung von Pili, aber auch nicht-filamentöser Organellen im Rahmen eines Chaperon-Usher-Pathways beteiligt (Hung *et al.*, 1996). Namensgeber für diese Chaperon-Familie ist das Protein PapD, das den Aufbau der Pap-Pili von *E. coli* unterstützt.

Das Programm Phyre, welches homologe Proteine über ihre in der Evolution konservierte Faltungsstruktur aufdecken kann, bestätigte, dass Mth59 große Ähnlichkeiten zu zahlreichen dieser periplasmatischen, PapD-ähnlichen Chaperone aufweist. Eine der Ähnlichkeiten bezieht sich auf FimC, dem Chaperon, das an der Assemblierung der am besten charakterisierten Pili, den Typ 1-Pili uropathogener *E. coli*-Stämme, mitwirkt. FimC bindet und stabilisiert die Pilus-Untereinheiten nach ihrer Sekretion in das Periplasma und schützt sie vor einer verfrühten Polymerisation (Soto *et al.*, 1998). Es wurde gezeigt, dass FimC dabei die Faltung der Pilus-Untereinheiten katalysiert und um den Faktor 100 beschleunigt (Vetsch *et al.*, 2004). Neben dieser Fähigkeit, nicht nur die Faltungseffizienz sondern auch die -rate der Zielproteine zu beeinflussen, unterscheiden sich die PapD-ähnlichen Chaperone auch dahingehend von den cytoplasmatischen, dass sie keine Energie benötigen (Jacob-Dubuisson *et al.*, 1994).

Wie alle PapD-ähnlichen Chaperone besitzt FimC zwei Immunglobulin-ähnliche Domänen, die in einer Bumerang-Form angeordnet sind. Auch die einzelnen Piline weisen eine Immunglobulin-ähnliche Struktur auf, wobei diese aufgrund eines fehlenden siebten β -Stranges inkomplett ist. In dem sich dadurch ergebenden, hydrophoben Spalt findet die 1:1-Interaktion zwischen FimC und dem Pilin statt. Dabei komplettiert das Chaperon mit einem seiner β -Stränge (G1-Strang) die Immunglobulin-ähnliche Faltung des Pilins. Dieser Mechanismus wird *donor strand complementation* genannt. Der gleiche hydrophobe Spalt wird auch zur Polymerisation der Piline während der Assemblierung des Zellanhangs genutzt. Hierbei erfolgt die Interaktion über einen 10 bis 20 Aminosäure langen, unstrukturierten N-Terminus, den alle Untereinheiten aufweisen, mit Ausnahme des sich an der Spitze des Typ 1-Pilus befindenden Adhäsins FimH. Über diese N-terminale Region findet ein *donor strand exchange* statt, bei dem der N-Terminus der nachfolgend in den Pilus einzubauenden Untereinheit den G1-Strang des Chaperons ersetzt. Dadurch kommt es zu einer nicht-kovalenten Bindung zwischen den Pilinen, während das Chaperon entlassen wird. Diese Polymerisation findet am Usher statt, einem Protein, das eine Pore in der äußeren Membran bildet und den Durchtritt des neu entstehenden Pilus erlaubt. Der Usher katalysiert die Polymerisation der verschiedenen Piline in einer charakteristischen Reihenfolge (siehe Abb. I.3) und wird erst durch Bindung eines Komplexes aus FimC und dem Adhäsins FimH initiiert (Allen *et al.*, 2012; Waksman & Hultgren, 2009).

Auch wenn für das Hauptfimbrin Mth60 keine Homologien zu bekannten Proteinen gefunden wurden und es demnach eine von den Fim- bzw. Pap-Pilinen abweichende Struktur aufzuweisen scheint, konnte über Co-Immunpräzipitationen eindeutig gezeigt werden, dass Mth59 und Mth60 miteinander interagieren. Hierzu wurden die beiden rekombinanten Proteine gemischt und auf Säulen mit immobilisierten Antikörpern geladen. Es kam zu einer Co-Elution beider Proteine, sowohl bei Verwendung von anti-Mth59 Antikörper, als auch jenen Antikörpern, die gegen die Mth60-Fimbrien gerichtet waren. Kontrollen machten deutlich,

dass die Co-Elution auf einer spezifischen Interaktion der Proteine beruhte und nicht etwa auf der Bindung am Säulenmaterial. Die Interaktion zwischen Mth59 und Mth60 trat unabhängig davon auf, ob der N-terminale His-Tag von Mth59 im Vorfeld der Reaktion abgespalten worden war, oder nicht. Demnach ist der N-Terminus des Proteins nicht an der Bindung von Mth60 beteiligt. Diese Annahme deckt sich mit bioinformatischen Analysen mit dem Programm 3DLigandSite, das die Aminosäuren Trp28, Phe34, Glu47, Arg51 und Glu99 als potentielle Bindungsstellen vorhersagte. Diese befinden sich im Mittelteil des 190 Aminosäuren langen Mth59.

Wie bereits erwähnt, werden die Piline in *E. coli* über einen bestimmten β -Strang, den G1-Strang des Chaperons gebunden. Dabei handelt es sich um die Positionen 101 bis 110 (von insgesamt 241; Capitani *et al.*, 2006), die die drei konservierten, hydrophoben Aminosäuren Leu103, Ile105 und Leu107 enthalten (Hung *et al.*, 1996; Sauer *et al.*, 1999). Zusätzlich zu diesem Donor-Strang, der die Immunglobulin-Faltung der Piline vervollständigt, finden sich in FimC und PapD zwei weitere, konservierte Aminosäuren: Arg8 und Lys112. Diese sind im Bereich zwischen den beiden Bumerang-förmig angeordneten Immunglobulin-Domänen des Chaperons lokalisiert und bilden Wasserstoffbrücken mit dem gebundenen Pilin aus (Hung *et al.*, 1996; Soto *et al.*, 1998).

Um zu überprüfen, ob die Bindung zwischen Mth59 und Mth60 spezifischer Natur ist, oder ob Mth59 auch mit anderen Proteinen interagiert, wurden Kontrollen mit Lysozym und BSA anstelle von Mth60 durchgeführt. Dabei zeigte Lysozym keine nennenswerte Interaktion mit Mth59. Im Fall von BSA kam es zwar zum Teil zu einer geringen Co-Elution, allerdings ist BSA ein Protein, das für seine „Klebeeigenschaften“ bekannt ist und deswegen auch zur Blockierung unspezifischer Bindungen zum Beispiel im Rahmen von Immunmarkierungen eingesetzt wird. Auch zur Absättigung von Reaktionsgefäßen kann BSA verwendet werden, weswegen auch entsprechende Blockierungspuffer im Handel erhältlich sind. Zwar wurde gezeigt, dass BSA in diesem Fall nicht an das Plastik des Säulchens oder an die Säulenmatrix gebunden hatte, dennoch ist in Anbetracht der geringen Co-Elution und des Charakters dieses Proteins nur von einer minimalen Interaktion zwischen Mth59 und BSA auszugehen. Diese ist vor allem im direkten Vergleich mit Mth60 als sehr gering einzustufen.

Ein weiterer Versuch zum direkten Nachweis der Interaktion zwischen den rekombinanten Proteinen Mth59 und Mth60 lag in einer Gelfiltrationschromatographie. Hierbei konnten die Proteine allerdings wider Erwarten nicht über den UV₂₈₀-Wert detektiert werden. Demnach waren sie entweder nicht konzentriert genug, oder wiesen eine schlechte UV-Absorption bei der entsprechenden Wellenlänge auf. Dies wäre vor allem bei geringen Anteilen von Aminosäuren mit aromatischen Seitenketten gegeben, wobei jedoch die Mengen dieser Aminosäuren in Mth59 in etwa der durchschnittlichen Häufigkeit in Proteinen entsprechen (Horton *et*

al., 2008). So macht Tryptophan 1,1 % der Aminosäuren aus, Tyrosin und das deutlich schwächer absorbierende Phenylalanin je 3,2 %.

Da die rekombinanten Proteine Mth60 und Mth59 in den Co-Immunpräzipitations-Reaktionen spezifisch miteinander interagiert hatten, ist davon auszugehen, dass auch die nativen Proteine eine derartige Bindung eingehen und Mth59 damit tatsächlich ein Chaperon ist, das an der Assemblierung der Mth60-Fimbrien beteiligt ist. Diese Hypothese sollte mithilfe von an Zelllysaten durchgeführten Co-Immunpräzipitationen überprüft werden. Im optimalen Fall hätten die Experimente auch dazu beitragen können, weitere Proteine, die mit dem Chaperon interagieren und demnach vermutlich Nebenfimbrine darstellen, aufzudecken. Jedoch lieferten die Co-Immunpräzipitationen unter Verwendung des anti-Mth59 Antikörpers keine Ergebnisse. Wurde der Antikörper gegen die Mth60-Fimbrien eingesetzt, so konnte einzig eine Proteinbande auf Höhe des Hauptfimbrins Mth60 detektiert werden. Dies hatte höchstwahrscheinlich den gleichen Grund, weswegen auch sämtliche durchgeführte Immunlokalisationsstudien erfolglos blieben: Es ist davon auszugehen, dass sich die (zelluläre) Menge an Mth59 unterhalb der Detektionsgrenze befindet. So konnte Mth59 weder in den fraktionierten Zellbestandteilen, noch im Zelllysat oder in den Fimbrien selbst detektiert werden. An Ultradünnschnitten von *M. thermoautotrophicus* DeltaH ließ sich ebenfalls keinerlei Markierung beobachten. Aus Zeitgründen konnte keine Einbettung der Zellen des Isolates AG5, das eine größere Anzahl an Fimbrien ausbildet, durchgeführt werden. Da diese Zellen vermutlich auch höhere Mengen des Chaperons exprimieren, sollte in einer nachfolgenden Arbeit überprüft werden, ob dieses detektiert werden kann. Allerdings erscheint es als unwahrscheinlich, dass die Markierung so stark wäre, dass von einer eindeutigen und spezifischen Bindung des Antikörpers gesprochen werden könnte. Die Klärung der Lokalisation von Mth59 wäre aber ein wichtiger Hinweis auf den Assemblierungsmechanismus der Mth60-Fimbrien.

Dass Mth59 nur in geringen Mengen in der Zelle vorkommt, konnte bereits durch die qRT-PCR-Ergebnisse gezeigt werden. Hierbei war die mRNA-Menge zwar nur um den Faktor 7,3 reduziert im Vergleich zur *mth60*-mRNA, allerdings kann nicht davon ausgegangen werden, dass die gesamte *mth59*-mRNA translatiert wird.

Eine niedrige Menge an Mth59 ist zudem plausibel, geht man von einer Analogie zu den bakteriellen Chaperon-Usher-Systemen aus. Zwar konnten in der Literatur keine Angaben zu den durchschnittlichen zellulären Mengen dieser bakteriellen Chaperone gefunden werden, jedoch stehen sie, wie bereits erwähnt, nach dem Entlassen eines Pilins dem nächsten Zielprotein zur Verfügung. Einen weiteren Hinweis, dass nur geringe Mengen der Chaperone benötigt werden, liefern nachfolgend erläuterte Ergebnisse für das Hauptpilin FimA: Es wurde gezeigt, dass das Protein über seinen N-Terminus auch mit dem eigenen hydrophoben Spalt interagieren kann und seine Faltungsstruktur damit selbst komplettiert (Puorger *et al.*, 2011). Somit wurde angenommen, dass sich FimA auf diese Weise im Periplasma

auch ohne die Hilfe eines Chaperons akkumuliert und vor einer Polymerisation und einer Proteolyse schützt. Bedenkt man, dass ein Typ 1-Pilus aus bis zu 3.000 Kopien dieses Hauptpilins besteht, so könnte es sich bei dem beschriebenen Phänomen um eine Möglichkeit handeln, bei Bedarf eine schnelle Assemblierung der Zellanhänge zu gewährleisten.

In welchem Zellkompartiment von *M. thermoautotrophicus* die Chaperon-Bindung und damit auch die Assemblierung der Fimbrien stattfindet, ist unklar. Während sich die homologen, bakteriellen Chaperone im Periplasma, dem Raum zwischen Cytoplasmamembran und äußerer Membran, befinden, fehlt dieses Kompartiment bei *M. thermoautotrophicus*. Das Archaeum weist einen Zellaufbau auf, der dem Gram-positiver Bakterien ähnelt. So ist der archaeellen Cytoplasmamembran eine dicke Pseudomureinschicht aufgelagert und durch das Fehlen eines S-Layers auch kein „pseudo-periplasmatischer Raum“ zwischen Cytoplasmamembran und S-Layer vorhanden. Allerdings wäre es möglich, dass sich Mth59 in dem Bereich zwischen Membran und Pseudomurein befindet. Auch wenn durch *in silico*-Analysen keine eindeutigen Angaben über die Lokalisation von Mth59 gemacht werden konnten, so sprechen doch die vorhergesagte Glykosylierung sowie das Signalpeptid für eine Lokalisation außerhalb der Cytoplasmamembran. Da die Fimbrien nach Hydrolyse der Pseudomureinschicht freigesetzt wurden, ist es denkbar, dass die Assemblierung der Zellanhänge im Bereich der Zellwand erfolgt.

Über Assemblierungsmechanismen archaeeller Fimbrien sind bislang allgemein noch keine Daten bekannt, da archaeelle Fimbrien noch kaum untersucht sind. Die einzigen Angaben zu vergleichbaren Zellanhängen beziehen sich auf die von den Autoren als Pili bezeichneten Oberflächenstrukturen von *Sulfolobus* (Fröls *et al.*, 2008; Ajon *et al.*, 2011; Henche *et al.*, 2012) und *Methanococcus maripaludis* (Ng *et al.*, 2011). Dabei weisen all diese Zellanhänge, genauso wie die eingangs erwähnten archaeellen Flagellen und die Fibers von *I. hospitalis* (siehe Kap. I) Ähnlichkeiten zu bakteriellen Typ IV-Pilinen auf und unterscheiden sich damit wohl eindeutig von den Mth60-Fimbrien von *M. thermoautotrophicus*.

5 Polymerisationsstudien

Über Polymerisationsstudien sollte geprüft werden, ob das rekombinant erzeugte Hauptfimbrin Mth60 zur spontanen Ausbildung von Fimbrien fähig ist. Solche Polymerisationen sind bereits von zahlreichen Protein-Monomeren bekannt: Ein Beispiel ist das Zellteilungsprotein FtsZ, das durch Polymerisation den sogenannten Z-Ring ausbildet und die Teilung der Zelle einleitet. FtsZ ist *in vitro* ebenfalls in der Lage, zu Filamenten zu polymerisieren (Mukherjee & Lutkenhaus, 1994). Auch der Zellteilungsfaktor ZapB, ein Protein, das die Assemblierung des Z-Rings stimuliert, kann *in vitro* Filamente bilden. Es wird angenommen, dass ZapB durch seine Polymerisierung die Ausbildung des Z-Rings anregt (Ebersbach *et al.*, 2008). Weitere Beispiele, in denen Proteinmonomere zu Filamenten polymerisieren,

stellen vor allem auch verschiedene Zellanhänge dar. So konnten für bakterielle Flagellen *in vitro* Rekonstitutionen der Monomere unabhängig davon beobachtet werden, ob Polymerisationskeime in Form von Flagellenbruchstücken vorhanden waren (Asakura *et al.*, 1964) oder nicht (Ishihara & Hotani, 1980). In beiden Fällen wurde allerdings mit nativen Monomeren gearbeitet, die durch Depolymerisation der Flagellen gewonnen worden waren. Auch Typ 1-Pili können nach entsprechender Dissoziation selbstständig wieder reassemblieren (Eshdat *et al.*, 1981). Dass rekombinant hergestellte Proteine ebenfalls geordnete Filamente ausbilden können, wurde bereits des Öfteren gezeigt. So konnte eine erfolgreiche *in vitro* Polymerisation der rekombinanten Cannulae-Proteine von *Pyrodictium abyssii* beobachtet werden (Mai, 1998). Bei diesen archaeeellen Zellanhängen (Rieger *et al.*, 1995) handelt es sich um hohle Röhren mit einem äußeren Durchmesser von ca. 25 nm, die die Periplasmen der Zellen verbinden (Nickell *et al.*, 2003). Sie sind aus (mindestens) drei homologen Glykoproteinen (CanA, CanB und CanC) aufgebaut, wobei nur CanA und CanB *in vitro* unter Zugabe zweiwertiger Ionen entsprechende Röhren ausbilden können (Mai, 1998). Eine weitere erfolgreiche Polymerisation konnte nach entsprechender Inkubation des rekombinant erzeugten Fiber-Proteins Iho670 von *I. hospitalis* verzeichnet werden (Meyer, 2010).

Auch für das Hauptfimbrin Mth60 von *M. thermoautotrophicus* wurde bereits eine gewisse Fähigkeit zur selbstständigen Ausbildung von Filamenten mit einem Durchmesser von 3 bis 6 nm dokumentiert (Frank, 2006; Thoma *et al.*, 2008). Jedoch handelte es sich bei dem hierbei verwendeten Protein um das unter IV.3 genannte, mit Hitzeschockproteinen assoziierte Mth60. Die im Rahmen dieser Arbeit erstmalig erfolgreiche Gewinnung von reinem, rekombinantem Mth60 ermöglichte die Durchführung neuer Polymerisationsstudien. Dabei zeigte sich eine eindeutige und starke Präferenz des Proteins, sich zu Filamenten zusammenzulagern, die mit einem Durchmesser von ca. 5 nm den nativen Fimbrien glichen. Da die Polymerisation spontan ablief, ist davon auszugehen, dass auch *in vivo* keine speziellen Enzyme für die Verknüpfung der Untereinheiten nötig sind. Damit kann eine Analogie zum Assemblierungsmechanismus der Pili Gram-positiver Bakterien ausgeschlossen werden, da diese nur in Anwesenheit der Sortase, eines Enzyms, das die kovalenten Bindungen zwischen den Pilinen erzeugt, gebildet werden (Manzano *et al.*, 2008). Ferner deuten die Ergebnisse darauf hin, dass auch *in vivo* keine zusätzliche Energie für die Polymerisation der Fimbrien-Untereinheiten nötig ist. Dies trifft auch auf die Assemblierung der bakteriellen Zellanhänge zu, die über den Chaperon-Usher-Pathway synthetisiert werden: Sie benötigen keine zusätzliche Energie in Form von ATP oder elektrochemischen Gradienten (Nishiyama *et al.*, 2008; Waksman & Hultgren, 2009).

Mth60 polymerisierte ab einer Temperatur von 37°C zu Fimbrien, deren Länge und Anzahl bis zur maximal untersuchten Temperatur von 95°C stetig zunahm. Damit ist die stärkste *in vitro* Polymerisationsfähigkeit der rekombinanten Proteine nicht bei der für *M. thermoautotrophicus* optimalen Temperatur gegeben, sondern 20°C oberhalb der maximalen Wachs-

tumsgrenze (Zeikus & Wolfe, 1972). Eine weitere Auffälligkeit bestand darin, dass die Fimbrien mit zunehmender Inkubationsdauer und steigender Temperatur dazu neigten, miteinander zu verdrillen. Der Grund hierfür könnte darin zu sehen sein, dass Proteine bei hohen Temperaturen dazu tendieren, sich zusammenzulagern. Diese Eigenschaft ist eine unter vielen Anpassungen (hyper-)thermophiler Proteine (Jaenicke & Böhm, 1998). Da eine ähnliche Verdrillung, die die adhäsiven Eigenschaften der Fimbrien aufzeigt, bei den aufgereinigten Fimbrien nicht auftrat, wäre es denkbar, dass die nativen Fimbrien nicht adhäsive Nebenproteine enthalten. Auch eine geringfügig abweichende Faltungsweise des renaturierten Mth60 könnte zu dieser Zusammenlagerung der polymerisierten Fimbrien geführt haben. Eine solche Abweichung wäre durch den nicht abspaltbaren, C-terminalen His-Tag erklärbar, der sich an dem rekombinanten Protein befand. Da die Polymerisation trotz dieser Histidin-Sequenz erfolgte, ist davon auszugehen, dass der C-Terminus nicht an der Interaktion der Untereinheiten beteiligt ist. Auch von den bakteriellen Typ 1- (Le Trong *et al.*, 2010) und Pap-Pili (Verger *et al.*, 2007) ist, wie unter IV.4 beschrieben, bekannt, dass nicht der C- sondern der N-terminale Bereich der prozessierten Piline zu deren Polymerisation beiträgt. Demnach war es eventuell von entscheidender Bedeutung, dass *E. coli* das rekombinante Mth60 prozessiert hatte. Ein N-terminales Signalpeptid hätte, im Falle einer Analogie zum bakteriellen System, höchstwahrscheinlich die Interaktion der Untereinheiten gestört oder gar verhindert.

Die Polymerisation der Monomere zu filamentösen Strukturen machte sich im SDS-Gel dadurch bemerkbar, dass die Proteinbanden mit der Zeit verschwanden. Dies hing aller Wahrscheinlichkeit nach mit einer verhinderten Einwanderung der Fimbrien in das Gel zusammen. Dabei war erstaunlich, dass kein allmählicher Bandenshift der monomeren Proteinformen in den höhermolekularen Bereich des Gels verzeichnet werden konnte.

Wie bereits erwähnt, wurde die größte Anzahl an Fimbrien bei einer Temperatur von 95°C beobachtet. Bei diesem Ansatz fiel gleichzeitig auch die stärkste Flockenbildung auf, die bei einer Inkubationstemperatur oberhalb von 65°C erstmals eintrat. An diese Flocken war stets eine Vielzahl von Fimbrien gebunden. Es ist davon auszugehen, dass es sich bei den Flocken um ausgefallene Proteine handelte. Der Grund für diese Annahme liegt darin, dass es mit steigender Temperatur zu einer stärkeren Verdunstung der Probe und damit einer Erhöhung der Salzkonzentration kam. Vermutlich wurde dadurch die Löslichkeit der Proteine soweit beeinflusst, dass ein Teil von ihnen ausfiel. Trotzdem konnte allerdings in diesem Ansatz die größte Anzahl an Fimbrien verzeichnet werden. Vergleichbare Daten ergaben sich bei der Rekonstitution der Typ 1-Pili von *E. coli*: Bei einer MgCl_2 -Konzentration von 50 mM fiel zwar ein Teil der Proteine aus, andererseits kam es auch zu einer deutlich stärkeren Polymerisation als bei 5 mM MgCl_2 (Eshdat *et al.*, 1981). Möglicherweise hängt also die gesteigerte Polymerisationseffizienz von Mth60 bei 95°C nicht zwingend mit der

Temperatur zusammen, sondern mit der versuchsbedingt erhöhten Konzentration an zweiwertigen Ionen. Aus Zeitgründen konnte dies jedoch nicht weiter überprüft werden.

Zweiwertige Ionen wie Ca^{2+} und Mg^{2+} sind in der Lage, Proteine durch Bindung an nach außen exponierte Carboxylreste der Aminosäuren Glutamat und Aspartat zu stabilisieren. Die oben genannten Ergebnisse wurden in Anwesenheit von (ursprünglich) je 20 mM MgCl_2 und CaCl_2 erzielt. Dass stabilisierende Ionen allerdings nicht zwingend nötig sind, zeigte sich bei dem Cytoskelett-Protein MreB, dessen Polymerisation durch Calcium- und Magnesium-Ionen sogar herabgesetzt wird (Esue *et al.*, 2005). Ferner kann die Struktur der gebildeten Filamente je nach Art der zweiwertigen Ionen drastisch verändert erscheinen. Im Fall des Proteins ZapB von *E. coli* führt die Zugabe von Magnesium- und Calcium-Ionen zu Kabel-ähnlichen Strukturen. Bei weiterer Erhöhung der Ca^{2+} -Konzentration lagern sich diese zusammen und formen semi-kristalline Bündel. Durch Zugabe des Komplexbildners EDTA lösen sich die beobachteten Strukturen in einzelne ZapB-Protofilamente auf (Ebersbach *et al.*, 2008).

Ansätze ohne zweiwertige Ionen lieferten beinahe die gleiche Menge an strukturell identischen Fimbrien wie die Kontrollansätze mit zweiwertigen Ionen, allerdings enthielten sie zusätzlich auch mehrere, nebeneinanderliegende, „perlenschnurartige“ Filamente. Die Periodizität dieser Filamente deutete darauf hin, dass es sich hierbei um Oligomere, nicht jedoch um Polymere handelte. Möglicherweise stellen die „Perlenschnüre“ Unterstrukturen der Fimbrien dar. Da diese Filamente in Anwesenheit zweiwertiger Ionen nicht auftraten, ist davon auszugehen, dass die Ionen einen positiven Effekt auf die korrekte Zusammenlagerung der Fimbrien ausüben. Wie aus vergleichenden Ansätzen, die ausschließlich Mg^{2+} oder Ca^{2+} enthielten, hervorging, scheinen aber nur Magnesium-Ionen die Polymerisation positiv zu beeinflussen. Calcium-Ionen führten dagegen zu einer deutlich verringerten Anzahl an Fimbrien. Dabei war die Fimbrienmenge sogar im Vergleich zum Ansatz ohne zweiwertige Ionen deutlich herabgesetzt, so dass davon auszugehen ist, dass Ca^{2+} sich nachteilig auf die Polymerisation von Mth60 auswirkt.

Diese Ergebnisse wurden zum wiederholten Male über Elektronenmikroskopie bestätigt, so dass kein Zweifel an ihrer Richtigkeit besteht. Die alleinige Auswertung von SDS-PAGE bzw. Western Blot hätte jedoch – unter Berücksichtigung des oben diskutierten Befundes, dass Fimbrien nicht in das Gel einwanderten – zu abweichenden Schlüssen geführt. Eine mögliche Ursache für diese Diskrepanz könnte darin begründet liegen, dass die Proteine ein unterschiedliches Migrationsverhalten im Gel aufweisen, abhängig von der Art und Menge der in der Probe enthaltenen Ionen.

Da es sich bei Mth59 mit höchster Wahrscheinlichkeit um ein Chaperon handelt, das an der Assemblierung der Mth60-Fimbrien beteiligt ist, sollte auch der Einfluss dieses Proteins auf die *in vitro* Polymerisation getestet werden. Hierzu wurden den Ansätzen verschiedene

Mengen des Chaperons zugegeben. Die Mischung der Proteine Mth59 und Mth60 im Verhältnis 1:1 führte zu keiner Fimbrienbildung. Dies kann als Zeichen gedeutet werden, dass die beiden Proteine miteinander interagiert hatten, so dass kein ungebundenes Mth60 mehr für die Polymerisation bereit stand.

Für das bereits erwähnte Protein FtsZ konnte zum Beispiel gezeigt werden, dass das Chaperon ClpX die selbstständige Polymerisation inhibiert. Nach Zugabe von 1,5 mM ClpX zu 2,5 mM FtsZ war die Assemblierung um etwa 70 % reduziert, weswegen davon ausgegangen wird, dass ClpX die Zellteilung über die FtsZ-Polymerisierung reguliert (Weart *et al.*, 2005). Im Fall der *E. coli* Typ 1-Pili ist bekannt, dass der sich in der äußeren Membran befindende Usher FimD die Polymerisierung der Chaperon-gebundenen Piline katalysiert und die Assemblierung des Pilus *in vitro* um den Faktor 1.000 beschleunigt (Nishiyama *et al.*, 2008). Möglicherweise gibt es in *M. thermoautotrophicus* ein ähnlich wirkendes Protein, das die Polymerisation des Chaperon-gebundenen Mth60 katalysiert.

Polymerisationsansätze, denen Mth59 in geringeren Mengen zugegeben wurde (1:100; 1:1.000; 1:2.000), ließen zwar eine verbesserte Fimbrienbildung als nach 1:1-Mischung erkennen, jedoch erschien die Anzahl der Fimbrien im Vergleich zu dem Kontrollansatz ohne Mth59 geringer. Demnach wirkte sich Mth59 unter den getesteten Bedingungen nicht positiv auf die Polymerisationsfähigkeit des Fimbrins Mth60 aus. Vergleichbare Literaturangaben zur *in vitro* Selbst-Assemblierung der Hauptpiline in Abhängigkeit von der An- bzw. Abwesenheit von Chaperonen konnten nicht gefunden werden, weswegen keine detailliertere Diskussion der Ergebnisse möglich ist.

In Zukunft sollte die Polymerisationsfähigkeit auch anhand von Fimbrien-Monomeren untersucht werden. Zu diesem Zweck müsste jedoch zunächst eine Methode gefunden werden, die Fimbrien effektiv zu denaturieren, was sich bislang schwierig bis unmöglich gestaltete (Frank, 2006).

6 Fazit

Im Rahmen dieser Arbeit konnten zahlreiche neue und wertvolle Erkenntnisse über die Mth60-Fimbrien von *M. thermoautotrophicus* gewonnen werden. So zeigte sich unter anderem, dass diese archaeellen Zellanhänge selbst unter den verwandten Methanogenen einzigartig zu sein scheinen. Im Gegensatz dazu wurden aber bedeutende Hinweise erhalten, dass eine gewisse Analogie zwischen dem Assemblierungsmechanismus der Mth60-Fimbrien und dem der Pili Gram-negativer Bakterien besteht: *In silico* Analysen deckten deutliche Ähnlichkeiten zwischen Mth59 und zahlreichen Chaperonen aus Gram-negativen Bakterien auf. Wie die letztgenannten Proteine, die Komplexe mit den Pilinen bilden, ist auch Mth59 in der Lage, spezifisch mit dem Fimbrin Mth60 zu interagieren. Dies wurde anhand rekombinanter Proteine ermittelt, wobei jedoch davon auszugehen ist, dass Mth59 und Mth60 auch *in vivo* im Zuge der Fimbrienassemblierung auf ähnliche Weise

interagieren. Ferner wurde gezeigt, dass sich rekombinantes Mth60 selbstständig zu Fimbrien zusammenlagern kann. Demnach erfolgt vermutlich auch die *in vivo* Polymerisation der Fimbrienproteine ohne zusätzliche Energie oder Enzyme. Dies stellt eine weitere Parallele zu den genannten, bakteriellen Pili dar. Für weiterführende Aussagen bezüglich des Assemblierungsmechanismus der Mth60-Fimbrien wird die Klärung der Funktion der beiden Proteine Mth58 und Mth61 von entscheidender Bedeutung sein.

V Zusammenfassung

Im Gegensatz zu bakteriellen Fimbrien und Pili, deren Struktur und Assemblierungsmechanismus zum Teil bis auf molekulare Ebene geklärt sind, existieren noch kaum Daten zu archaeellen Fimbrien. Das Ziel der vorliegenden Arbeit war daher eine nähere Untersuchung der 5 nm dicken Mth60-Fimbrien von *Methanothermobacter thermoautotrophicus*, die dem Organismus als Adhäsionsstrukturen dienen.

Zu diesem Zweck musste zunächst eine größere Menge der Fimbrien isoliert werden. Dies wurde erreicht, indem die Zellanhänge, die im Laufe der Zellernte abgesichert worden waren, aus dem Zentrifugationsüberstand gefällt wurden. Ferner wurde auch eine weitere Methode zur Gewinnung der Fimbrien etabliert: Dabei handelte es sich um die Freisetzung der zell-assoziierten Fimbrien über einen enzymatischen Verdau der Pseudomurein-Zellwand. Diese Methode kann in Zukunft vor allem dazu herangezogen werden, um potentielle Verankerungsstrukturen der Fimbrien aufzuzeigen. Erste Hinweise auf solche Verankerungen lieferten sowohl die Fimbrien von *M. thermoautotrophicus* als auch die von *Methanothermobacter marburgensis*. Antikörper, die gegen die Mth60-Fimbrien von *M. thermoautotrophicus* generiert und auf Kreuzreaktionen mit den Fimbrien von *M. marburgensis* und *Methanothermobacter fervidus* getestet wurden, zeigten die Einzigartigkeit der Mth60-Fimbrien auf. Diese wurde auch über *in silico* Analysen bestätigt.

Der Hauptbestandteil der Fimbrien von *M. thermoautotrophicus* ist das Hauptfimbrin Mth60, dessen kodierende Sequenz mit den benachbarten Genen innerhalb der beiden Operons *mth61/mth60* und *mth60/mth59/mth58* co-transkribiert wird. Über qRT-PCR wurde gezeigt, dass sich trotz dieser Co-Transkriptionen das *mth60*-Einzeltranskript um ein Vielfaches stärker in der Zelle akkumuliert, verglichen mit allen anderen (Co-)Transkripten. Dieses Ergebnis steht im Einklang mit der Funktion von Mth60 als Hauptbestandteil der Fimbrien.

Im Rahmen dieser Arbeit gelang es erstmalig, Mth60 in größeren Mengen und ohne Verunreinigungen durch *E. coli*-Proteine rekombinant herzustellen. Dies wurde über ein künstliches Genkonstrukt bewerkstelligt, das zum einen an die *codon usage* von *E. coli* angepasst worden war und zum anderen die Co-Expression von *mth59* ermöglichte. Dieses Gen kodiert für ein Protein, das laut bioinformatischen Analysen signifikante Homologien zu bestimmten periplasmatischen Chaperonen von Gram-negativen Bakterien aufweist. Diese Chaperone sind als Bestandteil des Chaperon-Usher-Pathways an der Assemblierung zahlreicher Oberflächenstrukturen, darunter verschiedener Pili, essentiell beteiligt. Die Chaperon-Funktion von Mth59 konnte über Co-Immunpräzipitationen mit rekombinanten Proteinen bestätigt werden, indem gezeigt wurde, dass Mth59 spezifisch mit dem Hauptfimbrin Mth60 interagiert.

Über *in vitro* Polymerisationsstudien wurde ferner die Fähigkeit des rekombinanten Mth60, sich selbstständig zu Fimbrien zusammenzulagern, aufgedeckt. Die auf diese Weise entstan-

denen Filamente glichen in ihrem Durchmesser den nativen Fimbrien. Die Polymerisation erfolgte in Abwesenheit von Enzymen und Energie und stellt damit eine weitere Gemeinsamkeit der Mth60-Fimbrien und der Pili Gram-negativer Bakterien dar.

Aufgrund dieser Ergebnisse kann also – im Hinblick auf den Assemblierungsmechanismus – von einer gewissen Ähnlichkeit zwischen den Mth60-Fimbrien und den Pili Gram-negativer Bakterien ausgegangen werden.

VI Anhang

1 Abkürzungsverzeichnis

Chemische Elementsymbole wurden gemäß der IUPAC-Richtlinien (International Union of Pure and Applied Chemistry) verwendet.

Im Text vorkommende Abkürzungen:

A	Ampère (elektrische Stromstärke)
Abb.	Abbildung
AK (1° bzw. 2°)	Antikörper (primär bzw. sekundär)
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin (<i>bovine serum albumin</i>)
cDNA	komplementärer DNA-Strang (<i>complementary DNA</i>)
Co-IP	Co-Immunpräzipitation
CsCl	Cäsiumchlorid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
DSMZ	Deutsche Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen
h	Stunde
IgG bzw. IgY	Immunglobulin G bzw. Y
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton [1.000 g/mol] (Molekulargewicht)
M	Molar
MALDI-TOF	<i>Matrix Assisted Laser Desorption/Ionisation-Time of flight</i>
mRNA	messenger-RNA („Boten-RNA“)
OD _x	optische Dichte bei einer Wellenlänge von x nm
ORF	open reading frame
p.a.	zur Analyse
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PCR	Polymerase-Ketten-Reaktion (Polymerase-Chain-Reaction)
pH	pondus hydrogenii (Wasserstoff-Exponent)
PVDF	Polyvinylidendifluorid
qPCR	quantitative PCR
qRT-PCR	quantitative Reverse-Transkriptions-PCR
REM	Rasterelektronenmikroskop
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
rRNA	ribosomale Ribonukleinsäure
RT	Reverse Transkription bzw. Raumtemperatur
s	Sekunde
S	Svedberg, Sedimentationskoeffizient
Tab.	Tabelle
TEM	Transmissionselektronenmikroskop
tRNA	transfer-Ribonukleinsäure

UAc	Uranylacetat
Upm	Umdrehungen pro Minute
UV	ultraviolett
V	Volt
v/v bzw. w/v	Volumen pro Volumen bzw. Gewicht pro Volumen

2 Nukleotid- und Aminosäuresequenzen

In dieser Arbeit wurde mit den Nukleotid- und Aminosäuresequenzen gearbeitet, die im Rahmen einer Nachsequenzierung ermitteln wurden (Sarbu, 2009). Sie weichen geringfügig von den in der Datenbank hinterlegten Sequenzen ab.

Nukleotidsequenzen von *meth61-meth58*

...AGAGGCAGCTAGGATCAGCAGGAGGTACCTCAGCAGGGTATCAACATCCCTCGACTTCAGGAG *meth62*
ACACACGAAGAGGAGGATGATCATCCGCACCCCTCTAGTCCAGGAATAAGGAAGACATCCCGACC
TATCGAAAATTATATAAAAAAGGTGTTCTTGCAATATTATATGAAGGTTGGGATTTCCATGAGGAC
GACAGTTATTTCCGTGATTTTATTGTTTCTAATCGTGGGGGGAATCTTCACAGCCGCGGGTGC
AATGAAACAGGTAACAATTCCTCTGCAGTGAATAAACTGTTAAAGGCGGGGGTGGGGTTCAGC
CACTCTCATTGTGTCAGCATCAATAGAGGTGGAGCCCTCAAGCATCAACCTGGGGACTGTCTACCC *meth61*
TGATGGCATCGAAAGGAGCTACCCCAACGCTGTAAACAGCGACTGTGACATACTTCTTTGCCTGG
CAGGATACCCCTTTCTGTGTCAGGGCCGATGGGAACCTTGTGAACACGGCTGACAGTTCACTCAGGA
TACCCCTATCCAGCCTCAAATTCAGCACCCCGAGCCTTAGCAAGAGGTCTTCACGACCTCCGA
TCAGACCATAATGACATACACCGGAGGGTCTTTCTCCCTGGATCAAGGAGTGTAAACATGAGC
CTTTACATCACGGTACCCCTACACTGACCCCGGTACCTATCAGACAACACTCATCTACACAG
CAACCTGACCAAACCGCTCCATCGAAAACCTGTTTTTGTGAACTCAGTCACATATACTTCAAAT
ATATGTTTTCTGGTGTACGAAAAATGAAAAAGATTATATAACATGCTGTGACAAATTAATTTTTTA
TCTGAAATACAGGTGATCAATATGAGGGAAAAGTTAATGGGAGTAATCCCGCTTATGGTTGCCC
TTGTGTTTGTGGTGGCAATAGGTGCATACAGCTCACCATCCTACGCGGCAACAGCAAGCCAGAC
AGTTACAGTTACAGTGCCAGAGGCCATCTCAATAGTTGTACCGAATGTTAACTTCGGGAGCATT
GCCGAGGAAGTGAAGGAACAAGCCCTGCTTTCACAGTAAGTAACACAGGTAACGTCAAGATAG *meth60*
ACCTCTACGTCAAGGCAGACGCATCAGCATTCAACAGCCCACTGCTACAGATACAATACCAAT
AACAGGGTTCAATATTTTCAGTAATGTACAGGTAACCTACCAGAACATCACAACCAGCTCCCTT
AAGATATATGACAACATGAACAAGGCATCCAGGGAGCAGGTACCCCGACAACATGGACAACAA
CACTCAGACTCTTTGTACCCCATTCACAGAGGACGGCACATACACAATAACAAACACATACAC
AGCAGTGAAGCATAACTCACCTGCACCATAAACTCCAATTCTAAACCCAACTTTTTTTCTATT
TTTAAAAATCTTTTAATACCTTAAGATTTAAACTCATTTTAAAGGTGGATGAACCATGAAAGTC
AGACACTTAACAGCCCTCTTAATGATCATATTCATAGTCCGATACGTGGCACCTGCAGTGGCAA
CAGGCCTCTGGGCATCACCGGCAGACTTCCGATACAACCTCAAGCCAGGAGATTCAGTGAGCGG
CGAGGTCACGGTGCAGAACATCGGCAAGGAGGAGGTAAGCGTCAACGTGACCAAGAAGAGGCTC *meth59*
CTCATGGACAGTGTGAACCTGGTGTACTCTGACAGGGGTATAGCCAGTGGATCACCATCGAAG
GTAACACGACCTTCAGGCTAAAACCCGGGGAGTCAAGGAAGATAAGATTACGGTCAACGCACC
TGGAAGATAAACTACCTCGACGCCGAGGGGCCCTGGTGATAAGGGGAGTGCCGGTCCAGAAT
GCAGCCACTGGACAGATACAGATAGTCCAGGGAGTCAAGTGGTGGTACCCATATATGTGGGTC
TCCCCGGGCCGATCATCGAGTCACTCAAACCTGGAGGACCACAAAGCACCACCATCTTCTGAG
CTTCATGCCCGGTAGGTTCACTACAACTCAAAAATACAGGTACAGTCTAGGCAAAACATGACA
GGGGCCATTGAACTCACTGGGATAACCGGTAAACAGAGGGTGCCCATCGATGGTGTCTGCTACC *meth58*
CTGAGGACAGCTACACACTGGTTGAGACATGGAAGCCGGGATGGCTTGAATTCGGACCATAACAC
CGCCCGGACAGAGATAAAGTATGGACGTTTCCATCAGACAAAGACCCTTGAGACCAGCGACACG
GTCATCGTGATACCTGCATGGCTGATAATCCTCCTCGTCTCGGAGCCACAGTGTGGGTGATCC
GTAAGAAGGGAATTGAACCTCCAATCGCGATCAAGATCGAGAGGAAAAAGTAATCCATCCTTTT
TTCTTTTCTACCATATTCTCAGTTAATTGATCACTTTATGCAGTTCTTCTAAACTATTTTGT
CTGAGCATCTCAGGATAATTCCATACAGTTCTCTTTTAAAGCATGTGAGTATTACAATACATCC
CATCATCACCAAGTAGTAATAATTAAGACTTATATGTTAGTAAGATCATTATTTTTTAATGAT... *meth57*

Aminosäuresequenzen

Mth61

MRTTVISVILLFLIVGGIFTAAANETGNNSSAVNKTVKGGGGVQPLSLSAS
IEVEPSSINLGTVPDGIERSYPNAVATVTYFFAWQDTLSVRADGNLVNTA
DSSLRIPLSSLKFSTPSLSKRSFTTSDQTIMTYTGGFFLPGSRSVTMSLYIT
VPPYTDPGTYQTTLIYTAT

Mth60 (Signalpeptid; aus Thoma, 2005)

VINMREKLMGVIPLMVALVFVVAIGAYSSPSYAATASQTVTVTVPEAISIVV
PNVNFGSIAAGSEGTSPTFTVSNVTGNVKIDLYVKADASAFTSPTATDTIPIT
GFNIFSNVTGNYQNITTSSLKIYDNMNKASQGAGTPTTWTTLRLFVPPFTE
DGTYTITNTYTAVKHNSPAP

Mth59

MKVRHLTALLMIIFIVGYVAPAVATGLWASPADFRYNLKP GDSVSGEVTVR
NIGKEEVSVNVTKRLLMDSVNLVYSDRGIAQWITIEGNTTFR LKPGESRKI
RFTVNAPGKINYLDAAGALVIRGVPVQNAATGQIQIVQGVELVVP IYVGLPG
PIESLKLEDHKAPTILLSFMPGRFTYKLKNTGTV

Mth58

MTGAIELTGITGKQRVPIDGVVYPEDSYTLVETWKPGWLEFGPYTARTEIK
YGRFHQTKTLETSDTVIVIPAWLIILLVLGATVWVIRKKGIEPPIAIKIERKK

3 Auswertung der qRT-PCR

Das Vorgehen bei der absoluten Quantifizierung von cDNA unter Verwendung eines Plasmids, in dessen *multiple cloning site* die entsprechende Gensequenz kloniert worden war, basierte auf zwei Veröffentlichungen (Lu *et al.*, 2012; Whelan *et al.*, 2003) und wurde wie folgt durchgeführt:

Zunächst wurde die Molekülmasse des Plasmids nach folgender Formel bestimmt:

$$\text{Molekülmasse in Dalton (g/mol)} = (\text{DNA-Länge in Basenpaare}) \times (660 \text{ g/mol pro Basenpaar})$$

Für pET-14b+*mth61-mth58* ergab sich mit einer Länge von insgesamt 6.828 bp eine Masse von 4.506.480 Dalton. Die Division dieser Zahl durch die Avogadro-Konstante ($6,022 \times 10^{23}$) lieferte eine sogenannte *copy number* (g/molecule) von $7,48 \times 10^{-18}$. Dividierte man die eingesetzte Plasmid-Menge pro Ansatz (je nach Verdünnung zwischen 0,6 pg und 0,06 fg) durch die sogenannte *copy number*, so ergab sich die Anzahl der Moleküle pro Reaktion. Die Rotor-Gene 6000 Software erstellte die Standardkurve durch Auftragung der C_T -Werte gegen den natürlichen Logarithmus der Moleküle pro Reaktion.

Aus dieser Standardkurve ermittelte die Software aufgrund der für die einzelnen cDNA-Verdünnungen bestimmten C_T -Werte die ursprüngliche Anzahl an Molekülen, die in die Reaktion eingesetzt worden war. Für die Dreifach-Ansätze der einzelnen Verdünnungsstufen wurden Mittelwerte gebildet, wobei in Ausnahmefällen Ausreißer aus der Berechnung ausgeschlossen wurden. Häufig musste auch die niedrigste Verdünnungsstufe aufgrund zu stark voneinander abweichender C_T -Werte außer Acht gelassen werden. Nach Einbeziehung der jeweils eingesetzten cDNA-Menge wurde der Durchschnittswert als Endwert der qRT-

PCR in Kopien pro ng cDNA bestimmt. Ein Beispiel für die Quantifizierung der *meth60*-mRNA ist in Tab. VI.1 aufgeführt. Wie aus den gezeigten Werten hervorgeht, lieferte der Ansatz, bei dem die Negativkontrolle aus der reversen Transkription (NK-RT) eingesetzt wurde, einen um den Faktor 25.000 niedrigeren Wert verglichen mit dem entsprechenden cDNA-Ansatz. Demnach war die cDNA nur zu einem vernachlässigbar geringen Anteil mit genomischer DNA verunreinigt und die erhaltenen Ergebnisse aussagekräftig. Die *no template control* mit H₂O war negativ (Daten nicht gezeigt).

Name	C _T -Wert	gegebene Konz. (Kopien/Reaktion)	berechnete Konz. (Kopien/Reaktion)	Ø berechnete Konz. (Kopien/Reaktion)	eingesetzte cDNA- Menge	Kopien/ ng cDNA
Plasmid_0,6 pg	15,74	80.179,76	90.279,11	88.006,37		
Plasmid_0,6 pg	15,74	80.179,76	90.288,38			
Plasmid_0,6 pg	15,85	80.179,76	83.622,51			
Plasmid_0,06 pg	19,37	8.017,98	7.364,58	7.355,00		
Plasmid_0,06 pg	19,46	8.017,98	6.948,09			
Plasmid_0,06 pg	19,3	8.017,98	7.775,63			
Plasmid_6 fg	22,5	801,7976	852,98	791,82		
Plasmid_6 fg	22,82	801,7976	684,65			
Plasmid_6 fg	22,5	801,7976	850,09			
Plasmid_0,6 fg	26,14	80,17976	68,89	70,2		
Plasmid_0,6 fg	26,09	80,17976	71,54			
cDNA_1:50	17,17		33.785,33	34.586,73	124 ng	278,93
cDNA_1:50	17,08		35.987,44			
cDNA_1:50	17,16		34.029,02			
cDNA_1:500	20,67		3.016,67	3.163,43	12,4 ng	255,12
cDNA_1:500	20,58		3.205,71			
cDNA_1:500	20,55		3.273,57			
cDNA_1:5000	24,15		272,36	266,96	1,24 ng	215,29
cDNA_1:5000	24,28		248,65			
cDNA_1:5000	24,11		280,94			
NK-RT_1:50	31,38		1,85	1,40	124 ng	0,01
NK-RT_1:50	31,45		1,77			
NK-RT_1:50	32,53		0,84			

Tab. VI.1: Absolute Quantifizierung der *meth60*-cDNA (Primerpaar qPCR_mth60_F/R) unter Zuhilfenahme des Plasmids pET-14b mit *meth61-meth58* als Insert. Konz: Konzentration. NK: Negativkontrolle. -RT: ohne reverse Transkriptase. Für nähere Erläuterungen siehe Text.

Tatsächlich muss der in Tab. VI.1 angegebene Endwert von etwa 249,78 Kopien/ng cDNA mit 2 multipliziert werden, da der erste Zyklus der PCR lediglich der Herstellung des komplementären DNA-Stranges diente. Um ein signifikantes Ergebnis zu erhalten, wurden die qRT-PCRs für jedes Primerpaar dreimal unabhängig voneinander durchgeführt, die Ergebnisse gemittelt und die Standardabweichungen berechnet. Die dabei erhaltenen Werte sind in Tab. VI.2 aufgeführt.

	1. qRT-PCR	2. qRT-PCR	3. qRT-PCR	Mittelwert (\pm Standardabweichung)
<i>mth61</i>	74,88	84,06	75,84	78,26 (\pm 5,05)
<i>mth61-mth60</i>	43,2	29,22	40,36	37,59 (\pm 7,39)
<i>mth60</i>	499,56	370,12	497,94	455,87(\pm 74,27)
<i>mth60-mth59</i>	12,8	11,6	10,54	11,65 (\pm 1,13)
<i>mth59</i>	65,7	70,32	52,15	62,72 (\pm 9,44)
<i>mth59-mth58</i>	97,14	96,78	102,48	98,80 (\pm 3,19)
<i>mth58</i>	131,58	137,22	144,48	137,76 (\pm 6,47)

Tab. VI.2: Auflistung aller durch qRT-PCRs erhaltenen Transkriptmengen in Kopien/ng cDNA, dem daraus errechneten Mittelwert sowie der Standardabweichung.

Die restlichen zu Tab. VI.1 analogen Tabellen für alle durchgeführten qRT-PCRs finden sich auf der Begleit-CD (siehe VI.5). Diese enthält auch die Originaldaten der Rotor-Gene 6000 Software.

4 Ergänzende Abbildungen

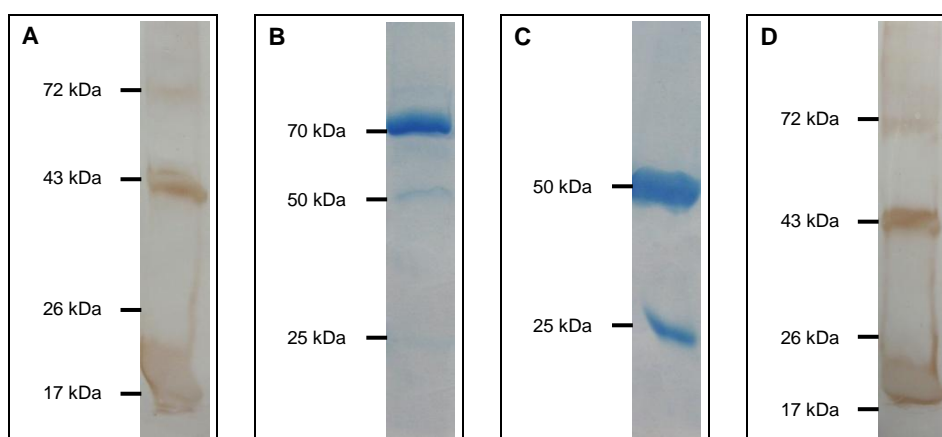


Abb. VI.1: Analysen zur Generierung und Aufreinigung der rabbit anti-Mth59 IgGs. A: Western Blot zur Titerbestimmung des Testserums nach der dritten Booster-Injektion. Testserum 1:10.000; 2° AK goat anti-rabbit, 1:2.000. Bei den Proteinbanden auf Höhe von 40 und 70 kDa handelt es sich vermutlich um Oligomere des 22 kDa-Proteins Mth59. B: SDS-PAGE (12,5 % AA, Coomassie-gefärbt) des Immunsersums vor der Aufreinigung der Antikörper zeigt eine dominante Bande bei 70 kDa und eine sehr schwache Bande bei 50 kDa. C: SDS-PAGE (12,5 % AA, Coomassie-gefärbt) der aufgereinigten Antikörper zeigt die typischen IgG-Banden auf Höhe von 50 kDa (schwere Ketten) und 25 kDa (leichte Ketten). D: Western Blot zur Titerbestimmung der aufgereinigten Antikörper. 1° AK rabbit anti-Mth59 1:5.000; 2° AK goat anti-rabbit, 1:2.000.

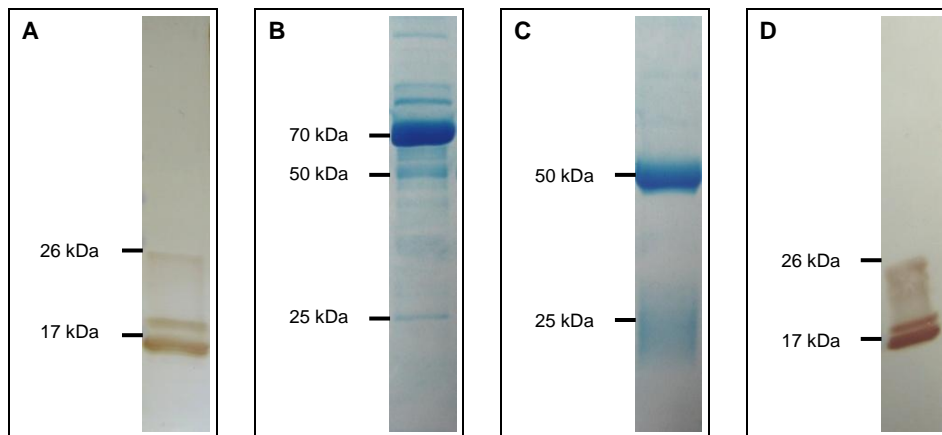


Abb. VI.2: Analysen zur Generierung und Aufreinigung der rabbit anti-Mth60-Fimbrien IgGs. A: Western Blot zur Titerbestimmung des Testserums nach einer Booster-Injektion. Testserum 1:30.000; 2° AK goat anti-rabbit, 1:2.000. B: SDS-PAGE (12,5 % AA, Coomassie-gefärbt) des Immunsersums vor der Aufreinigung der Antikörper zeigt eine dominante Bande bei 70 kDa sowie viele schwächere Banden. C: SDS-PAGE (12,5 % AA, Coomassie-gefärbt) der aufgereinigten Antikörper zeigt eine starke Bande bei 50 kDa (schwere Ketten) und einen Schmier im Bereich von 25 kDa (leichte Ketten der IgGs). D: Western Blot zur Titerbestimmung der aufgereinigten Antikörper. 1° AK rabbit anti-Mth59 1:10.000; 2° AK goat anti-rabbit, 1:2.000.

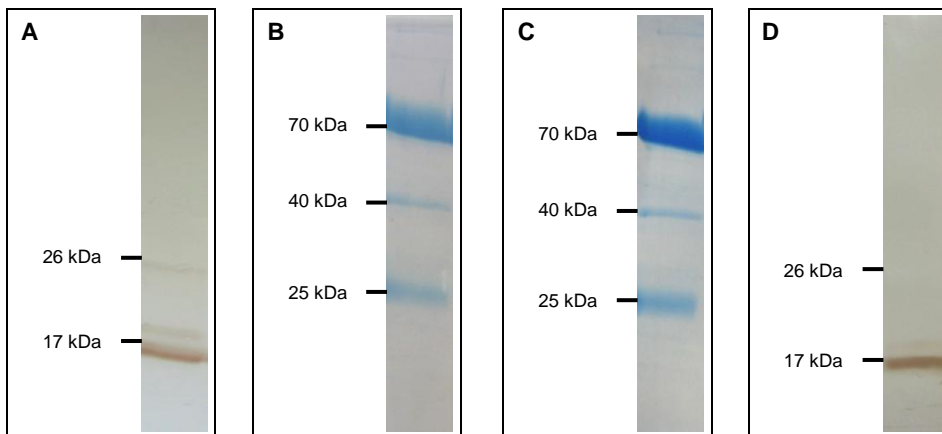


Abb. VI.3: Analysen zur Generierung und Aufreinigung der chicken anti-Mth60-Fimbrien IgYs. Western Blot zur Titerbestimmung der Eidotter-Lösung nach einer Booster-Injektion. Eidotter-Lösung 1:30.000; 2° AK goat anti-chicken, 1:2.000. B+C: SDS-PAGEs (12,5 % AA, Coomassie-gefärbt) der aus dem Eidotter gewonnenen Lösung vor (B) und nach (C) dem Versuch zur weiteren Aufreinigung über einen speziellen IgY-Kit. Die dominanten Banden bei etwa 70 und 25 kDa stellen die schweren sowie die leichten Ketten der IgY-Antikörper dar. D: Western Blot zur Titerbestimmung der aufgereinigten Antikörper. 1° AK chicken anti-Mth59 1:5.000; 2° AK goat anti-chicken, 1:2.000.

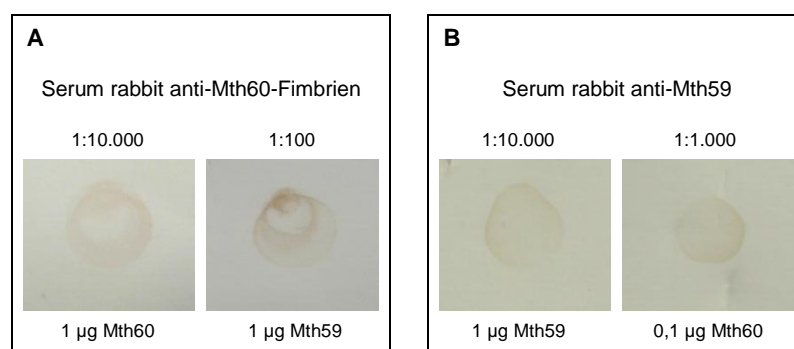
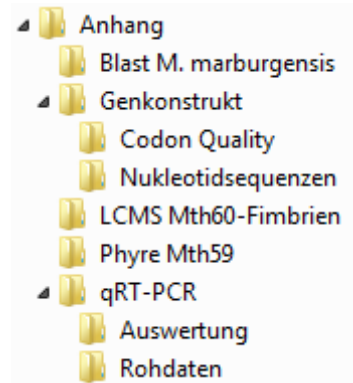


Abb. VI.4: Überprüfung auf Kreuzreaktionen der rekombinanten Proteine Mth59 und Mth60 mit dem jeweils anderen Antiserum. A: Durch Vergleich der eingesetzten Protein- und Antisera-Mengen zeigt sich, dass Mth59 mit dem Antiserum gegen die Mth60-Fimbrien nur im Verhältnis 100 schwächer reagiert als Mth60. B: Mth60 reagiert mit dem Antiserum gegen Mth59 nur im Verhältnis 100 schwächer als Mth59. 2° AK goat anti-rabbit, 1:2.000.

5 Begleit-CD

Die sich auf der Begleit-CD befindenden Daten sind in der folgenden Ordnerstruktur dargestellt. Da einige Abbildungen druckerbedingt nicht optimal wiedergegeben werden können, enthält die CD auch eine pdf-Datei der Arbeit.



VII Literaturverzeichnis

- Ajon, M., Fröls, S., von Wolferen, M., Stoecker, K., Teichmann, D., Driessen, A.J., Grogan, D.W., Albers, S.-V. & Schleper, C. (2011). UV-inducible DNA exchange in hyperthermophilic archaea mediated by type IV pili. *Mol. Microbiol.*, 82: 807-817
- Alam, M. & Oesterhelt, D. (1984). Morphology, function and isolation of halobacterial flagella. *J. Mol. Biol.*, 176: 459-475
- Albers, S.-V., Szabó, Z. & Driessen, A.J. (2003). Archaeal homolog of bacterial type IV prepilin signal peptidases with broad substrate specificity. *J. Bacteriol.*, 185: 3918-3925
- Allen, W.J., Phan, G. & Waksman, G. (2012). Pilus biogenesis at the outer membrane of Gram-negative bacterial pathogens. *Curr. Opin. Struct. Biol.*, 22: 500-506
- Anderson, I., Djao, O.D., Misra, M., Chertov, O., Nolan, M., Lucas, S., Lapidus, A., Del Rio, T.G., Tice, H., Cheng, J.-F. *et al.* (2010). Complete genome sequence of *Methanothermobacter thermautotrophicus* strain (V24S^T). *Stand. Genomic Sci.*, 3: 315-324
- Anderson, I., Ulrich, L.E., Lupa, B., Susanti, D., Porat, I., Hooper, S.D., Lykidis, A., Sieprawska-Lupa, M., Dharmarajan, L., Goltsman, E. *et al.* (2009). Genomic characterization of Methanomicrobiales reveals three classes of methanogens. *PLoS ONE*, 4: e5797
- Andersson, A.F., Lundgren, M., Eriksson, S., Rosenlund, M., Bernander, R. & Nilsson, P. (2006). Global analysis of mRNA stability in the archaeon *Sulfolobus*. *Genome Biol.*, 7: R99
- Anfinsen, C.B. (1973). Principles that govern the folding of protein chains. *Science*, 181: 223-230
- Asakura, S., Eguchi, G. & Iino, T. (1964). Reconstruction of bacterial flagella *in vitro*. *J. Mol. Biol.*, 10: 42-56
- Bagos, P.G., Tsigirgos, K.D., Plessas, S.K., Liakopoulos, T.D. & Hamodrakas, S.J. (2009). Prediction of signal peptides in archaea. *Protein Eng. Des. Sel.*, 22: 27-35
- Balch, W.E., Fox, G.E., Magrum, L.J., Woese, C.R. & Wolfe, R.S. (1979). Methanogens: reevaluation of a unique biological group. *Microbiol. Rev.*, 43: 260-296
- Bapteste, É., Brochier, C. & Boucher, Y. (2005). Higher-level classification of the Archaea: evolution of methanogenesis and methanogens. *Archaea*, 1: 353-363
- Bardy, S.L. & Jarrell, K.F. (2003). Cleavage of preflagellins by an aspartic acid signal peptidase is essential for flagellation in the Archaeon *Methanococcus voltae*. *Mol. Microbiol.*, 50: 1339-1347
- Bardy, S.L., Mori, T., Komoriya, K., Aizawa, S.-I. & Jarrell, K.F. (2002). Identification and localization of flagellins FlaA and FlaB3 within flagella of *Methanococcus voltae*. *J. Bacteriol.*, 184: 5223-5233
- Bardy, S.L., Ng, S.Y. & Jarrell, K.F. (2003). Prokaryotic motility structures. *Microbiology*, 149: 295-304
- Bardy, S.L., Ng, S.Y. & Jarrell, K.F. (2004). Recent advances in the structure and assembly of the archaeal flagellum. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.*, 7: 41-51
- Barns, S.M., Delwiche, C.F., Palmer, J.D. & Pace, N.R. (1996). Perspectives on archaeal diversity, thermophily and monophyly from environmental rRNA sequences. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 93: 9188-9193
- Bellack, A. (2011). Cell architecture and flagella of hyperthermophilic Archaea. *Dissertation am Lehrstuhl für Mikrobiologie, Universität Regensburg*
- Bellack, A., Huber, H., Rachel, R., Wanner, G. & Wirth, R. (2011). *Methanocaldococcus villosus* sp. nov., a heavily flagellated archaeon that adheres to surfaces and forms cell-cell contacts. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 61: 1239-1245

- Bennett-Lovsey, R.M., Herbert, A.D., Sternberg, M.J. & Kelley, L.A. (2008). Exploring the extremes of sequence/structure space with ensemble fold recognition in the program Phyre. *Proteins*, 70: 611-625
- Blöchl, E., Rachel, R., Burggraf, S., Hafenbradl, D., Jannasch, H.W. & Stetter K.O. (1997). *Pyrolobus fumarii*, gen. and sp. nov. represents a novel group of archaea, extending the upper temperature limit for life to 113°C. *Extremophiles*, 1: 14-21
- Blum, H., Beier, H. & Gross H.J. (1987). Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamid gels. *Electrophoresis*, 8: 93-99
- Bradford, M.M. (1976): A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.*, 72: 248-254
- Brochier-Armanet, C., Boussau, B., Gribaldo, S. & Forterre, P. (2008). Mesophilic crenarchaeota: proposal for a third archaeal phylum, the Thaumarchaeota. *Nat. Rev. Microbiol.*, 6: 245-252
- Cai, X., Wang, R., Filloux, A., Waksman, G. & Meng, G. (2011). Structural and functional characterization of *Pseudomonas aeruginosa* CupB chaperones. *PLoS ONE*, 6: e16583
- Capitani, G., Eidam, O., Glockshuber, R. & Grütter, M.G. (2006). Structural and functional insights into the assembly of type 1 pili from *Escherichia coli*. *Microbes Infect.*, 8: 2284-2290
- Chaban, B., Ng, S.Y., Kanbe, M., Saltzman, I., Nimmo, G., Aizawa, S. & Jarrell, K.F. (2007). Systematic deletion analyses of the *fla* genes in the flagella operon identify several genes essential for proper assembly and function of flagella in the archaeon *Methanococcus maripaludis*. *Mol. Microbiol.*, 66: 596-609
- Chang, C., Mandlik, A., Das, A. & Ton-That, H. (2011). Cell surface display of minor pilin adhesins in the form of a simple heterodimeric assembly in *Corynebacterium diphtheriae*. *Mol. Microbiol.*, 79: 1236-1247
- Claus, H. & König, H. (2010). Cell envelopes of methanogens. In: König, H., Claus, H., Varma, A. (editors) Prokaryotic cell wall compounds. Berlin: Springer, 231-251
- Cohen-Krausz, S. & Trachtenberg, S. (2008). The flagellar filament structure of the extreme acidothermophile *Sulfolobus shibatae* B12 suggests that archaeabacterial flagella have a unique and common symmetry and design. *J. Mol. Biol.*, 375: 1113-1124
- Craig, L. & Li, J. (2008). Type IV pili: paradoxes in form and function. *Curr. Opin. Struct. Biol.*, 18: 267-277
- Craig, L., Volkmann, N., Arval, A.S., Pique, M.E., Yeager, M., Egelman, E.H. & Tainer, J.A. (2006). Type IV pilus structure by cryo-electron microscopy and crystallography: implications for pilus assembly and functions. *Mol. Cell*, 23: 651-662
- Cruden, D., Sparling, R. & Markovetz, A.J. (1989). Isolation and ultrastructure of the flagella of *Methanococcus thermolithotrophicus* and *Methanospirillum hungatei*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 55: 1414-1419
- Danscher, G. (1981). Localization of gold in biological tissue. A photochemical method for light and electron microscopy. *Histochemistry*, 71: 81-88
- Di Giulio, M. (2003). The universal ancestor was a thermophile or a hyperthermophile: tests and further evidence. *J. Theor. Biol.*, 221: 425-436
- Dietl, K. (2006). Untersuchung des Flagellins von *Pyrococcus furiosus*. *Diplomarbeit* am Lehrstuhl für Mikrobiologie, Universität Regensburg
- Doddema, H.J., Derksen, J.W. & Vogels, G.D. (1979). Fimbriae and flagella of methanogenic bacteria. *FEMS Microbiol. Lett.*, 5: 135-138
- Du, Y., Rosqvist, R. & Forsberg, Å. (2002). Role of fraction 1 antigen of *Yersinia pestis* in inhibition of phagocytosis. *Infect. Immun.*, 70: 1453-1460

- Duguid, J.P., Smith, I.W., Dempster, G. & Edmunds, P.N. (1955). Non-flagellar filamentous appendages ("fimbriæ") and hæmagglutinating activity in *Bacterium coli*. *J. Path. Bact.*, 70: 335-348
- Dunn, S.D. (1986). Effects of the modification of transfer buffer composition and the renaturation of proteins in gels on the recognition of proteins on western blots by monoclonal antibodies. *Anal. Biochem.*, 157: 144-153
- Ebersbach, G., Galli, E., Møller-Jensen, J., Löwe, J. & Gerdes, K. (2008). Novel coiled-coil cell division factor ZapB stimulates Z ring assembly and cell division. *Mol. Microbiol.*, 68: 720-735
- Edman, P. (1950). Method for the determination of amino acid sequence in peptides. *Acta Chem. Scand.*, 4: 283-293
- Elkins, J.G., Podar, M., Graham, D.E., Makarova, K.S., Wolf, Y., Randau, L., Hedlund, B.P., Brochier-Armanet, C., Kunin, V., Anderson, I. *et al.* (2008). A korarchaeal genome reveals insights into the evolution of the Archaea. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 105: 8102-8107
- Eshdat, Y., Silverblatt, F.J. & Sharon, N. (1981). Dissociation and reassembly of *Escherichia coli* type 1 pili. *J. Bacteriol.*, 148: 308-314
- Esue, O., Cordero, M., Wirtz, D. & Tseng, Y. (2005). The assembly of MreB, a prokaryotic homolog of actin. *J. Biol. Chem.*, 280: 2628-2635
- Faguy, D.M. & Jarrell, K.F. (1999). A twisted tale: the origin and evolution of motility and chemotaxis in prokaryotes. *Microbiology*, 145: 279-281
- Fauconnier, A., Allaoui, A., Campos, A., van Elsen, A., Cornelis, G.R. & Bollen, A. (1997). Flagellar *flhA*, *flhB* and *flhE* genes, organized in an operon, cluster upstream from the *inv* locus in *Yersinia enterocolitica*. *Microbiology*, 143: 3461-3471
- Flemming, H.-C. & Wingender, J. (2001). Biofilme - die bevorzugte Lebensform der Bakterien: Flocken, Filme und Schlämme. *Biologie in unserer Zeit*, 31: 169-180
- Frank, M. (2006). Untersuchungen zu den Fimbrien von *Methanothermobacter thermoautotrophicus* AG5. *Diplomarbeit* am Lehrstuhl für Mikrobiologie, Universität Regensburg
- Fröls, S., Ajon, M., Wagner, M., Teichmann, D., Zolghadr, B., Folea, M., Boekema, E.J., Driessen, A.J., Schleper, C. & Albers, S.-V. (2008). UV-inducible cellular aggregation of the hyperthermophilic archaeon *Sulfolobus solfataricus* is mediated by pili formation. *Mol. Microbiol.*, 70: 938-952
- Fuchs, G., Stupperich, E. & Thauer, R.K. (1978). Acetate assimilation and the synthesis of alanine, aspartate and glutamate in *Methanobacterium thermoautotrophicum*. *Arch. Microbiol.*, 117: 61-66
- Gasteiger, E., Hoogland, C., Gattiker, A., Duvaud, S., Wilkins, M.R., Appel, R.D. & Bairoch, A. (2005). Protein identification and analysis tools on the ExPASy server. In: Walker, J.M. (editor) *The Proteomics Protocols Handbook*. New York: Humana Press, 571-607
- Gerl, L. & Sumper, M. (1988). Halobacterial flagellins are encoded by a multigene family. *J. Biol. Chem.*, 263: 13246-13251
- Gupta, R. & Brunak, S. (2002). Prediction of glycosylation across the human proteome and correlation to protein function. *Pac. Symp. Biocomput.*, 7: 310-322
- Hahn, E., Wild, P., Hermanns, U., Sebbel, P., Glockshuber, R., Häner, M., Taschner, N., Burkhard, P., Aepli, U. & Müller, S.A. (2002). Exploring the 3D molecular architecture of *Escherichia coli* type 1 pili. *J. Mol. Biol.*, 323: 845-857
- Hall, T. (1999). BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl. Acids Symp. Ser.*, 41: 95-98
- Held, C. (2006). Charakterisierung der Zellanhänge methanogener Archaeen. *Diplomarbeit* am Lehrstuhl für Mikrobiologie, Universität Regensburg

- Henche, A.-L., Ghosh, A., Yu, X., Jeske, T., Egelman, E. & Albers, S.-V. (2012). Structure and function of the adhesive type IV pilus of *Sulfolobus acidocaldarius*. *Environ. Microbiol.*, 14: 3188-3202
- Herzog, B. & Wirth, R. (2012). Swimming behavior of selected species of Archaea. *Appl. Environ. Microbiol.*, 78: 1670-1674
- Herzog, B. (2009). Vergleichende Analyse des Schwimmverhaltens verschiedener Archaeen. *Diplomarbeit am Lehrstuhl für Mikrobiologie, Universität Regensburg*
- Holt, J.G., Krieg, N.R., Sneath, P.H., Staley, J.T. & Williams, S.T. (2000). *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, 9th ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 719-736
- Horton, H.R., Moran, L.A., Scrimgeour, K.G., Perry, M.D. & Rawn, J.D. (2008). *Biochemie*, 4. Auflage. London: Pearson Studium
- Huber, H. (2006). Euryarchaeota. In: *Encyclopedia of Life Sciences*. John Wiley & Sons, <http://www.els.net>
- Huber, H., Hohn, M.J., Rachel, R., Fuchs, T., Wimmer, V.C. & Stetter, K.O. (2002). A new phylum of Archaea represented by a nanosized hyperthermophilic symbiont. *Nature*, 417: 63-67
- Huber, R., Dyba, D., Huber, H., Burggraf, S. & Rachel, R. (1998). Sulfur-inhibited *Thermosphaera aggregans* sp. nov., a new genus of hyperthermophilic archaea isolated after its prediction from environmentally derived 16S rRNA sequences. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 48: 31-38
- Huber, R., Langworthy, T.A., König, H., Thomm, M., Woese, C.R., Sleytr, U.B. & Stetter, K.O. (1986). *Thermotoga maritima* sp. nov. represents a new genus of unique extremely thermophilic eubacteria growing up to 90°C. *Arch. Microbiol.*, 144: 324-333
- Huber, R., Wilharm, T., Huber, D., Trincone, A., Burggraf, S., König, H., Rachel, R., Rockinger, I., Fricke, H. & Stetter, K.O. (1992). *Aquifex pyrophilus* gen. nov. sp. nov, represents a novel group of marine hyperthermophilic hydrogen-oxidizing bacteria. *System. Appl. Microbiol.*, 15: 340-351
- Hung, D.L., Knight, S.D., Woods, R.M., Pinkner, J.S. & Hultgren, S.J. (1996). Molecular basis of two subfamilies of immunoglobulin-like chaperones. *EMBO J.*, 15: 3792-3805
- Ikura, K., Kokubu, T., Natsuka, S., Ichikawa, A., Adachi, M., Nishihara, K., Yanagi, H. & Utsumi, S. (2002). Co-overexpression of folding modulators improves the solubility of recombinant guinea pig liver transglutaminase expressed in *Escherichia coli*. *Prep. Biochem. Biotechnol.*, 32: 189-205
- Ishihara, A. & Hotani, H. (1980). Micro-video study of discontinuous growth of bacterial flagellar filaments *in vitro*. *J. Mol. Biol.*, 139: 265-276
- Jacob-Dubuisson, F., Striker, R. & Hultgren, S.J. (1994). Chaperone-assisted self-assembly of pili independent of cellular energy. *J. Biol. Chem.*, 259: 12447-12455
- Jaenicke, R. & Böhm, G. (1998). The stability of proteins in extreme environments. *Curr. Opin. Struct. Biol.*, 8: 738-748
- Janker, C. (2008). Anheftung ausgewählter Archaeen an unterschiedliche Oberflächen inkl. Literaturrecherche zu Zellanhängen von Bakterien und Archaeen. *Diplomarbeit am Lehrstuhl für Mikrobiologie, Universität Regensburg*
- Jarrell, K.F. & Albers, S.-V. (2012). The archaeellum: an old motility structure with a new name. *Trends Microbiol.*, 20: 307-312
- Jarrell, K.F., Bayley, D.P. & Kostyukova, A.S. (1996). The archaeal flagellum: a unique motility structure. *J. Bacteriol.*, 178: 5057-5064
- Jarrell, K.F. & Koval, S.F. (1989). Ultrastructure and biochemistry of *Methanococcus voltae*. *Crit. Rev. Microbiol.*, 17: 53-87

- Jarrell, K.F., Stark, M., Nair, D.B. & Chong, J.P. (2011). Flagella and pili both are necessary for efficient attachment of *Methanococcus maripaludis* to surfaces. *FEMS Microbiol. Lett.*, 319: 44-50
- Julenius, K., Mølgaard, A., Gupta, R. & Brunak, S. (2005). Prediction, conservation analysis, and structural characterization of mammalian mucin-type O-glycosylation sites. *Glycobiology*, 15: 153-164
- Käll, L., Krogh, A. & Sonnhammer, E.L. (2007). Advantages of combined transmembrane topology and signal peptide prediction - the Phobius web server. *Nucl. Acids Res.*, 35: W429-432
- Kalmokoff, M.L. & Jarrell, K.F. (1991). Cloning and sequencing of a multigene family encoding the flagellins of *Methanococcus voltae*. *J. Bacteriol.*, 173: 7113-7125
- Kalmokoff, M.L., Jarrell, K.F. & Koval, S.F. (1988). Isolation of flagella from the archaebacterium *Methanococcus voltae* by phase separation with Triton X-114. *J. Bacteriol.*, 170: 1752-1758
- Kalmokoff, M.L., Koval, S.F. & Jarrell, K.F. (1992). Relatedness of the flagellins from methanogens. *Arch. Microbiol.*, 157: 481-487
- Kane, J.F. & Hartley, D.L. (1988). Formation of recombinant protein in *Escherichia coli*. *Trends Biotechnol.*, 6, 95-101
- Kelley, L.A. & Sternberg, M.J. (2009). Protein structure prediction on the Web: a case study using the Phyre server. *Nat. Protoc.*, 4: 363-371
- Krogh, A., Larsson, B., von Heijne, G. & Sonnhammer, E.L. (2001). Predicting transmembrane protein topology with a hidden Markov model: application to complete genomes. *J. Mol. Biol.*, 305: 567-580
- Kupper, J., Marwan, W., Typke, D., Grunberg, H., Uwer, U., Gluch, M. & Oesterhelt, D. (1994). The flagellar bundle of *Halobacterium salinarum* is inserted into a distinct polar cap structure. *J. Bacteriol.*, 176: 5184-5187
- Kutsukake, K., Ohya, Y., Yamaguchi, S. & Iino, T. (1988). Operon structure of flagellar genes in *Salmonella typhimurium*. *Mol. Gen. Genet.*, 214: 11-15
- Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227: 680-685
- Lassak, K., Neiner, T., Ghosh, A., Klingl, A., Wirth, R. & Albers, S.-V. (2012). Molecular analysis of the crenarchaeal flagellum. *Mol. Microbiol.*, 83: 110-124
- Le Trong, I., Aprikian, P., Kidd, B.A., Thomas, W.E. & Sokurenko, E.V. (2010). Donor strand exchange and conformational changes during *E. coli* fimbrial formation. *J. Struct. Biol.*, 172: 380-388
- Lee, A.M., Sevinsky, J.R., Bundy, J.L., Grunden, A.M. & Stephenson, J.L. (2009). Proteomics of *Pyrococcus furiosus*, a hyperthermophilic archaeon refractory to traditional methods. *J. Proteome Res.*, 8: 3844-3851
- Liesegang, H., Kaster, A.-K., Wiezer, A., Goenrich, M., Wollherr, A., Seedorf, H., Gottschalk, G. & Thauer, R.K. (2010). Complete genome sequence of *Methanothermobacter marburgensis*, a methanoarchaeon model organism. *J. Bacteriol.*, 192: 5850-5851
- Lu, Y., Xie, L. & Chen, J. (2012). A novel procedure for absolute real-time quantification of gene expression patterns. *Plant Methods*, 8: 9
- Luo, Y., Pfister, P., Leisinger, T. & Wasserfallen, A. (2002). Pseudomurein endoisopeptidases PeiW and PeiP, two moderately related members of a novel family of proteases produced in *Methanothermobacter* strains. *FEMS Microbiol. Lett.*, 208: 47-51
- Macnab, R.M. (2003). How bacteria assemble flagella. *Annu. Rev. Microbiol.*, 57: 77-100

- Mai, B. (1998). *In vitro* Untersuchungen zum extrazellulären Netzwerk von *Pyrodictium abyssi* TAG11. *Dissertation* am Lehrstuhl für Mikrobiologie, Universität Regensburg
- Mandlik, A., Das, A. & Ton-That, H. (2008). The molecular switch that activates the cell wall anchoring step of pilus assembly in gram-positive bacteria. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 105: 14147-14152
- Manzano, C., Contreras-Martel, C., El Mortaji, L., Izoré, T., Fenel, D., Vernet, T., Schoehn, G., Di Guilmi, A.M. & Dessen, A. (2008). Sortase-mediated pilus fiber biogenesis in *Streptococcus pneumoniae*. *Structure*, 16: 1838-1848
- Marwan, W., Alam, M. & Oesterhelt, D. (1991). Rotation and switching of the flagellar motor assembly in *Halobacterium halobium*. *J. Bacteriol.*, 173: 1971-1977
- Masek, T., Vopalensky, V., Suchomelova, P. & Pospisek, M. (2004). Denaturing RNA electrophoresis in TAE agarose gels. *Anal. Biochem.*, 336: 46-50
- Matsudaira, P. (1987). Sequence from picomole quantities of proteins electroblotted onto polyvinylidene difluoride membranes. *J. Biol. Chem.*, 262: 10035-10038
- Mattick, J.S. (2002). Type IV pili and twitching motility. *Annu. Rev. Microbiol.*, 56: 289-314
- Meyer, C. (2010). Die Fibers von *Ignicoccus hospitalis*: Ultrastruktur, Verankerung und molekularbiologische Untersuchungen. *Dissertation* am Lehrstuhl für Mikrobiologie, Universität Regensburg
- Miller, J.H. (1972). Experiments in molecular genetics. New York: Cold Spring Harbor Laboratory
- Moissl, C., Rachel, R., Briegel, A., Engelhardt, H. & Huber, R. (2005). The unique structure of archaeal 'hami', highly complex cell appendages with nono-grappling hooks. *Mol. Microbiol.*, 56: 361-370
- Moissl, C., Rudolph, C., Rachel, R., Koch, M. & Huber, R. (2003). In situ growth of the novel SM1 euryarchaeon from a string-of-pearls-like microbial community in its cold biotope, its physical separation and insights into its structure and physiology. *Arch. Microbiol.*, 180: 211-217
- Morgan, D.G., Owen, C., Melanson, L.A. & DeRosier, D.J. (1995). Structure of bacterial flagellar filaments at 11 Å resolution: packing of the alpha-helices. *J. Mol. Biol.*, 249: 88-110
- Mu, X.-Q., Egelman, E.H. & Bullitt, E. (2002). Structure and Function of Hib Pili from *Haemophilus influenzae* type b. *J. Bacteriol.*, 184: 4868-4874
- Müller, D.W., Meyer, C., Gürster, S., Küper, U., Huber, H., Rachel, R., Wanner, G., Wirth, R. & Bellack, A. (2009). The Iho670 fibers of *Ignicoccus hospitalis*: A new type of archaeal cell surface appendage. *J. Bacteriol.*, 191: 6465-6468
- Mukherjee, A. & Lutkenhaus, J. (1994). Guanine nucleotide-dependent assembly of FtsZ into filaments. *J. Bacteriol.*, 176: 2754-2758
- Mulvey, M.A., Lopez-Boado, Y.S., Wilson, C.L., Roth, R., Parks, Q.C., Heuser, J. & Hultgren, S.J. (1998). Induction and evasion of host defenses by type 1-piliated uropathogenic *Escherichia coli*. *Science*, 282: 1494-1497
- Nakamura, K., Takahashi, A., Mori, C., Tamaki, H., Mochimaru, H., Nakamura, K., Takamizawa, K., Kamagata, Y. (im Druck). *Methanothermobacter tenebrarum* sp. nov., a hydrogenotrophic thermophilic methanogen isolated from gas-associated formation water of a natural gas field in Japan. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*
- Natale, P., Brüser, T. & Driessen, A.J. (2008). Sec- and Tat-mediated protein secretion across the bacterial cytoplasmic membrane - Distinct translocases and mechanisms. *Biochim. Biophys. Acta*, 1778: 1735-1756
- Näther, D. (2007). Untersuchung der Flagellen von *Pyrococcus furiosus*. *Dissertation* am Lehrstuhl für Mikrobiologie, Universität Regensburg

- Näther, D.J., Rachel, R., Wanner, G. & Wirth, R. (2006). Flagella of *Pyrococcus furiosus*: Multifunctional organelles, made for swimming, adhesion to various surfaces, and cell-cell contacts. *J. Bacteriol.*, 188: 6915-6923
- Ng, S.Y., Chaban, B. & Jarrell, K.F. (2006). Archaeal flagella, bacterial flagella and type IV pili: A comparison of genes and posttranslational modifications. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.*, 11: 167-191
- Ng, S.Y., Wu, J., Nair, D.B., Logan, S.M., Robotham, A., Tessier, L., Kelly, J.F., Uchida, K., Aizawa, S.-I. & Jarrell, K.F. (2011). Genetic and mass spectrometry analyses of the unusual type IV-like pili of the archaeon *Methanococcus maripaludis*. *J. Bacteriol.*, 193: 804-814
- Nickell, S., Hegerl, R., Baumeister, W. & Rachel, R. (2003). *Pyrodictium* cannulae enter the periplasmic space but do not enter the cytoplasm, as revealed by cryo-electron tomography. *J. Struct. Biol.*, 141: 34-42
- Nilsson, P. & Uhlin, B.E. (1991). Differential decay of a polycistronic *Escherichia coli* transcript is initiated by RNaseE-dependent endonucleolytic processing. *Mol. Microbiol.*, 5: 1791-1799
- Nilsson, P., Naureckiene, S. & Uhlin, B.E. (1996). Mutations affecting mRNA processing and fimbrial biogenesis in the *Escherichia coli* *pap* operon. *J. Bacteriol.*, 178: 683-690
- Nishihara, K., Kanemori, M., Yanagi, H. & Yura, T. (2000). Overexpression of trigger factor prevents aggregation of recombinant proteins in *Escherichia coli*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 66: 884-889
- Nishiyama, M., Horst, R., Eidam, O., Herrmann, T., Ignatov, O., Vetsch, M., Bettendorff, P., Jelesarov, I., Grütter, M., Wüthrich, K., Glockshuber, R. & Capitani, G. (2005). Structural basis of chaperone-subunit complex recognition by the type 1 pilus assembly platform FimD. *EMBO J.*, 24: 2075-2086
- Nishiyama, M., Ishikawa, T., Rechsteiner, H. & Glockshuber, R. (2008). Reconstitution of pilus assembly reveals a bacterial outer membrane catalyst. *Science*, 320: 376-379
- Ottow, J. (1975). Ecology, physiology, and genetics of fimbriae and pili. *Annu. Rev. Microbiol.*, 29: 79-108
- Patenge, N., Berendes, A., Engelhardt, H., Schuster, S.C., & Oesterhelt, D. (2001). The *fla* gene cluster is involved in the biogenesis of flagella in *Halobacterium salinarum*. *Mol. Microbiol.*, 41: 653-663
- Patti, J.M., Allen, B.L., McGavin, M.J. & Höök, M. (1994). MSCRAMM - Mediated Adherence of Microorganisms to Host Tissues. *Annu. Rev. Microbiol.*, 48: 585-617
- Petersen, T.N., Brunak, S., von Heijne, G. & Nielsen, H. (2011). SignalP 4.0: discriminating signal peptides from transmembrane regions. *Nat. Methods*, 8: 785-786
- Pfister, P., Wasserfallen, A., Stettler, R. & Leisinger, T. (1998). Molecular analysis of *Methanobacterium* phage ψ M2. *Mol. Microbiol.*, 30: 233-244
- Puorger, C., Vetsch, M., Wider, G. & Glockshuber, R. (2011). Structure, folding and stability of FimA, the main structural subunit of type 1 pili from uropathogenic *Escherichia coli* strains. *J. Mol. Biol.*, 412: 520-535
- Rieger, G., Rachel, R., Hermann, R. & Stetter K.O. (1995). Ultrastructure of the hyperthermophilic archaeon *Pyrodictium abyssi*. *J. Struct. Biol.*, 115: 78-87
- Santangelo, T.J., Cubonová, L., Skinner, K.M. & Reeve, J.N. (2009). Archaeal intrinsic transcription termination *in vivo*. *J. Bacteriol.*, 191: 7102-7108
- Sára, M. & Sleytr, U.B. (1987). Molecular sieving through S-layers of *Bacillus stearothermophilus* strains. *J. Bacteriol.*, 169: 4092-4098
- Sára, M. & Sleytr, U.B. (2000). S-Layer Proteins. *J. Bacteriol.*, 182: 859-868

- Sarbu, C. (2009). Liegt das Fimbringen *mth60* von *Methanothermobacter thermoautotrophicus* in einem Operon? *Diplomarbeit* am Lehrstuhl für Mikrobiologie, Universität Regensburg
- Sauer, F.G., Fütterer, K., Pinkner, J.S., Dodson, K.W., Hultgren, S.J. & Waksman, G. (1999). Structural basis of chaperone function and pilus biogenesis. *Science*, 285: 1058-1061
- Sauer, F.G., Remaut, H., Hultgren, S.J. & Waksman, G. (2004). Fiber assembly by the chaperone-usheer pathway. *Biochim. Biophys. Acta*, 1694: 259-267
- Saulino, E.T., Bullitt, E. & Hultgren, S.J. (2000). Snapshots of usher-mediated protein secretion and ordered pilus assembly. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 97: 9240-9245
- Schägger, H. & von Jagow, G. (1987). Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Anal. Biochem.*, 166: 368-379
- Schlieker, C., Bukau, B. & Mogk, A. (2002). Prevention and reversion of protein aggregation by molecular chaperones in the *E. coli* cytosol: implications for their applicability in biotechnology. *J. Biotechnol.*, 96: 13-31
- Schmid, S. (2009). Vergleichende Analyse archaeeeller Fimbrien. *Diplomarbeit* am Lehrstuhl für Mikrobiologie, Universität Regensburg
- Schopf, S. (2011). Untersuchungen der Flagellen von *Pyrococcus furiosus*: Flagellenvermittelte Interaktionen, Ultrastruktur und Molekularbiologie. *Dissertation* am Lehrstuhl für Mikrobiologie, Universität Regensburg
- Sjölblad, R.D., Emala, C.W. & Doetsch, R.N. (1983). Invited review: Bacterial flagellar sheaths: Structures in search of a function. *Cell Motility*, 3: 93-103
- Smith, D.R., Doucette-Stamm, L.A., Deloughery, C., Lee, H., Dubois, J., Bashirzadeh, R., Blakely, D., Cook, R., Gilbert, K., Harrison, D. *et al.* (1997). Complete genome sequence of *Methanobacterium thermoautotrophicum* deltaH: functional analysis and comparative genomics. *J. Bacteriol.*, 179: 7135-7155
- Smyth, C.J., Marron, M.B., Twohig, J.M. & Smith, S.G. (1996). Fimbrial adhesins: similarities and variations in structure and biogenesis. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.*, 16: 127-139
- Söding, J., Biegert, A. & Lupas, A.N. (2005). The HHpred interactive server for protein homology detection and structure prediction. *Nucl. Acids Res.*, 33: 244-248
- Soto, G.E., Dodson, K.W., Ogg, D., Liu, C., Heuser, J., Knight, S., Kihlberg, J., Jones, C.H. & Hultgren, S.J. (1998). Periplasmic chaperone recognition motif of subunits mediates quaternary interactions of the pilus. *EMBO J.*, 17: 6155-6167
- Spang, A., Hatzenpichler, R., Brochier-Armanet, C., Rattei, T., Tischler, T., Spieck, E., Streit, W., Stahl, D.A., Wagner, M. & Schleper, C. (2010). Distinct gene set in two different lineages of ammonia-oxidizing archaea supports the phylum Thaumarchaeota. *Trends Microbiol.*, 18: 331-340
- Stetter, K.O. (2006). Hyperthermophiles in the history of life. *Phil. Trans. R. Soc. B*, 361: 1837-1843
- Stetter, K.O., Thomm, M., Winter, J., Wildgruber, G., Huber, H., Zillig, W., Janecovic, D., König, H. Palm, P. & Wunderl, S. (1981). *Methanothermus fervidus*, sp. nov., a novel extremely thermophilic methanogen isolated from an Icelandic hot spring. *Zbl. Bakt. Hyg., I. Abt. Orig. C* 2: 166-178
- Tanaka, K., Waki, H., Ido, Y., Akita, S., Yoshida, Y. & Yoshida, T. (1988). Protein and polymer analyses up to m/z 100000 by laser ionization time-of-flight mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 2: 151-153
- Thanassi, D.G., Saulino, E.T., Lombardo, M.-J., Roth, R., Heuser, J. & Hultgren, S.J. (1998). The PapC usher forms an oligomeric channel: Implications for pilus biogenesis across the outer membrane. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 95: 3146-3151

- Thoma, C., Frank, M., Rachel, R., Schmid, S., Näther, D., Wanner, G. & Wirth, R. (2008). The Mth60 fimbriae of *Methanothermobacter thermoautotrophicus* are functional adhesins. *Environ. Microbiol.*, 10: 2785-2795
- Thoma, C.A. (2005). Charakterisierung der Zellanhänge von *Methanothermobacter thermoautotrophicus*. *Diplomarbeit* am Lehrstuhl für Mikrobiologie, Universität Regensburg
- Thomas, N.A. & Jarrell, K.F. (2001). Characterization of flagellum gene families of methanogenic archaea and localization of novel flagellum accessory proteins. *J. Bacteriol.*, 183: 7154-7164
- Thomas, N.A., Bardy, S.L. & Jarrell, K.F. (2001). The archaeal flagellum: a different kind of prokaryotic motility structure. *FEMS Microbiol. Rev.*, 25: 147-174
- Thompson, J.D., Higgins, D.G. & Gibson, T.J. (1994). CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucl. Acids Res.*, 22: 4673-4680
- Ton-That, H. & Schneewind, O. (2003). Assembly of pili on the surface of *Corynebacterium diphtheriae*. *Mol. Microbiol.*, 50: 1429-1438
- Towbin, H., Staehelin, T. & Gordon, J. (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 76: 4350-4354
- Trachtenberg, S., Galkin, V.E. & Egelman, E.H. (2005). Refining the structure of the *Halobacterium salinarum* flagellar filament using the iterative helical real space reconstruction method: Insights into polymorphism. *J. Mol. Biol.*, 346: 665-676
- van Ham, S.M., van Alphen, L., Mool, F.R. & van Putten, J.P. (1994). The fimbrial gene cluster of *Haemophilus influenzae* type b. *Mol. Microbiol.*, 13: 673-684
- Verger, D., Bullitt, E., Hultgren, S.J. & Waksman, G. (2007). Crystal structure of the P pilus rod subunit PapA. *PLoS Pathogens*, 3: e73
- Vetsch, M., Puorger, C., Spirig, T., Grauschopf, U., Weber-Ban, E.U. & Glockshuber, R. (2004). Pilus chaperones represent a new type of protein-folding catalyst. *Nature*, 431: 329-332
- Waegel, I., Schmid, G., Thumann, S., Thomm, M. & Hausner, W. (2010). Shuttle vector-based transformation system for *Pyrococcus furiosus*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 76: 3308-3313
- Waksman, G. & Hultgren, S.J. (2009). Structural biology of the chaperone-usher pathway of pilus biogenesis. *Nature Rev.*, 7: 765-774
- Wall, D. & Kaiser, D. (1999). Type IV pili and cell motility. *Mol. Microbiol.*, 32: 1-10
- Walter, S. & Buchner, J. (2002). Molekulare Chaperone: zelluläre Maschinen für die Proteinfaltung. *Angew. Chem.*, 114: 1142-1158
- Wang, Y.A., Yu, X., Ng, S.Y., Jarrell, K.F. & Egelman, E.H. (2008). The structure of an archaeal pilus. *J. Mol. Biol.*, 381: 456-466
- Wang, Y.A., Yu, X., Silverman, P.M., Harris, R.L. & Egelman, E.H. (2009). The structure of F-pili. *J. Mol. Biol.*, 385: 22-29
- Wass, M.N., Kelley, L.A. & Sternberg, M.J. (2010). 3DLigandSite: predicting ligand-binding sites using similar structures. *Nucl. Acids Res.*, 38: W469-473
- Wasserfallen, A., Nolling, J., Pfister, P., Reeve, J. & Conway de Macario, E. (2000). Phylogenetic analysis of 18 thermophilic *Methanobacterium* isolates supports the proposals to create a new genus, *Methanothermobacter* gen. nov., and to reclassify several isolates in three species, *Methanothermobacter thermoautotrophicus* comb. nov., *Methanothermobacter wolfeii* comb. nov., and *Methanothermobacter marburgensis* sp. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 50: 43-53

- Weart, R.B., Nakano, S., Lane, B.E., Zuber, P. & Levin, P.A. (2005). The ClpX chaperone modulates assembly of the tubulin-like protein FtsZ. *Mol. Microbiol.*, 57: 238-249
- Westers, L., Westers, H. & Quax, W.J. (2004). *Bacillus subtilis* as cell factory for pharmaceutical proteins: a biotechnological approach to optimize the host organism. *Biochim. Biophys. Acta*, 1694: 299-310
- Whelan, J.A., Russell, N.B., Whelan, M.A. (2003). A method for the absolute quantification of cDNA using real-time PCR. *J. Immunol. Methods*, 278: 261-269
- Whitman, W.B., Bowen, T.L. & Boone, D.R. (2006). The methanogenic Bacteria. In: Dworkin, M. (editor) *The Prokaryotes*, 3rd ed., vol. 3. New York: Springer, 165-207
- Woese, C.R. & Fox, G.E. (1977). Phylogenetic structure of the prokaryotic domain: The primary kingdoms. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 74: 5088-5090
- Woese, C.R., Kandler, O. & Wheelis, M. (1990). Towards a natural system of organisms: proposal for the domains Archaea, Bacteria, and Eucarya. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 87: 4576-4579
- Woese, C.R., Magrum, L.J. & Fox, G.E. (1978). Archaeobacteria. *J. Mol. Evol.*, 11: 245-252
- Wolfe, R.S. (1993). An historical overview of methanogenesis. In: Ferry, G.J. (editor) *Methanogenesis: Ecology, Physiology, Biochemistry & Genetics*. New York: Chapman & Hall, 1-32
- Yanagawa, R., Otsuki, K. & Tokui, T. (1968). Electron microscopy of fine structure of *Corynebacterium renale* with special reference to pili. *Jap. J. Vet. Res.*, 16: 31-37
- Yonekura, K., Maki-Yonekura, S. & Namba, K. (2003). Complete atomic model of the bacterial flagellar filament by electron cryomicroscopy. *Nature*, 424: 643-650
- Yu, N.Y., Wagner, J.R., Laird, M.R., Melli, G., Rey, S., Lo, R., Dao, P., Sahinalp, S.C., Ester, M., Foster, L.J. & Brinkman, F.S. (2010). PSORTb 3.0: improved protein subcellular localization prediction with refined localization subcategories and predictive capabilities for all prokaryotes. *Bioinformatics*, 26: 1608-1615
- Yu, X., Goforth, C., Meyer, C., Rachel, R., Wirth, R., Schröder, G.F. & Egelman, E.H. (2012). Filaments from *Ignicoccus hospitalis* show diversity of packing in proteins containing N-terminal type IV pilin helices. *J. Mol. Biol.*, 422: 274-281
- Zavialov, A.V., Kersley, J., Korpela, T., Zav'yalov, V.P., MacIntyre, S. & Knight, S.D. (2002). Donor strand complementation mechanism in the biogenesis of non-pilus systems. *Mol. Microbiol.*, 45: 983-995
- Zeikus, J.G. & Wolfe, R.S. (1972). *Methanobacterium thermoautotrophicus* sp. n., an anaerobic, autotrophic, extreme thermophile. *J. Bacteriol.*, 109: 707-713
- Zeikus, J.G. & Wolfe, R.S. (1973). Fine structure of *Methanobacterium thermoautotrophicum*: Effect of growth temperature on morphology and ultrastructure. *J. Bacteriol.*, 113: 461-467
- Zhang, J.P. & Normark, S. (1996). Induction of gene expression in *Escherichia coli* after pilus-mediated adherence. *Science*, 273: 1234-1236
- Zinder, S.H. (1993). Physiological ecology of methanogens. In: Ferry, G.J. (editor) *Methanogenesis: Ecology, Physiology, Biochemistry & Genetics*. New York: Chapman & Hall, 128-206

Abschließend möchte ich allen denen danken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben! **Mein besonderer Dank gilt:**

... vor allem meinem Doktorvater, **Prof. Dr. Reinhard Wirth**, für die Möglichkeit, die Arbeit an diesem vielversprechenden Thema fortzuführen, das mich bereits während der Diplomarbeit begeistert hat. Vielen Dank für die hervorragende Betreuung, zahlreiche Anregungen und Ratschläge, die stetige Diskussionsbereitschaft und allgemein für die Unterstützung während der vergangenen Jahre!

... **Prof. Dr. Reinhard Rachel**, für das Interesse an meiner Arbeit, die zahlreichen theoretischen und praktischen Hilfen am TEM, diverse wissenschaftliche Anregungen, sowie viele hilfreiche und interessante Informationen!

... **Prof. Dr. Susanne Modrow** und **Prof. Dr. Reinhard Sterner**, für die Bereitschaft zur Übernahme des RIGeL-Mentorats, die hilfreichen Diskussionen und wertvollen Denkanstöße!

... **Prof. Dr. Michael Thomm**, für die Möglichkeit meine Doktorarbeit an seinem Lehrstuhl durchzuführen!

... **Prof. Dr. Rainer Deutzmann** und **Eduard Hochmuth** für die Durchführung und Auswertung der unzähligen Sequenzierungen und massenspektrometrischen Analysen!

... **Robert Reichelt**, für die enorme Hilfsbereitschaft, die ich in den letzten Jahren des Öfteren in Anspruch genommen habe. Vielen Dank für die zahlreichen Hilfen zur Planung, Durchführung und Auswertung der qRT-PCRs! Ebenfalls bedanken möchte ich mich für die Hilfe bei den Antikörper-Aufreinigungen an der ÄKTA!

... **Simone Schopf**, für die Übernahme des Projektes „Pyroglue“ und die anfänglichen Arbeiten mit dem Genkonstrukt! Vielen Dank vor allem auch für das Korrekturlesen der Arbeit!

... **Petra Schwendner**, ebenfalls für das Korrekturlesen der Arbeit!

... **Jennifer Flechsler**, für die Einführung am Ultramikrotom, die Tipps zur Durchführung von Immunmarkierungen und vor allem für den kurzfristig organisierten „Rettet-Christina-Methodenkurs“! Für letzteren danke ich auch **Thomas Heimerl**! Herzlichen Dank auch an **Benjamin Salecker**, der bei zahlreichen technischen Problemen mit dem TEM stets Hilfe wusste!

... **Thomas Hader** und **Konrad Eichinger**, für die Durchführung der Fermentationen, sowie die Hilfsbereitschaft bei sämtlichen anstehenden Problemen!

... **Christine Meese**, für das Hochdruckgefrieren, die Gefriersubstitution und die Einbettung der Zellen!

... **Veronika Dollhofer**, für die während ihres Praktikums durchgeführten Experimente!

... **Lydia Kreuter**, für die Hilfe bei der Gelfiltration an der ÄKTA!

... den **restlichen Mitgliedern** des Lehrstuhls für Mikrobiologie, darunter vor allem **Wolfgang Forster** für seine Hilfe bei Computer-Problemen, sowie **Gabi Leichtl** und **Elisabeth Nagelfeld**, die bei allen möglichen Fragen und Problemen stets mit Rat und Tat zur Seite standen!

Eidesstattliche Erklärung

Ich erkläre hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Die aus anderen Quellen direkt oder indirekt übernommenen Daten und Konzepte sind unter Angabe des Literaturzitats gekennzeichnet.

Regensburg, Februar 2013