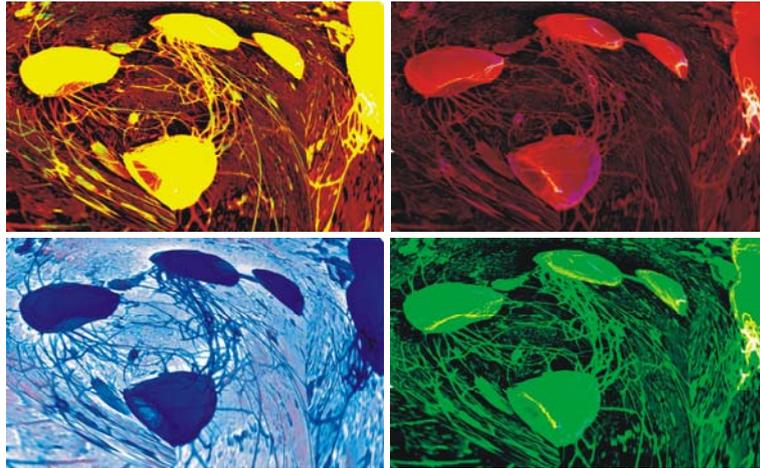


Untersuchung der Flagellen von *Pyrococcus furiosus*



DISSERTATION

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



vorgelegt von

Daniela Näther

aus Hof/Saale

Regensburg, 2007

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

Promotionsgesuch eingereicht am: 24.10.2007

Tag der mündlichen Prüfung: 15.01.2008

Prüfungsausschuss:

Vorsitzender Prof. Dr. T. Dresselhaus

1. Gutachter Prof. Dr. R. Wirth

2. Gutachter Prof. Dr. R. Sterner

3. Prüfer Prof. Dr. S. Schneuwly

***Science is re-doing it all the time,
therefore it's called re-search!***

(Craig Mello)

Inhaltsverzeichnis

I. Einleitung	1
II. Material und Methoden	7
1. Bezugsquellen	7
1.1 Chemikalien und Methoden.....	7
1.2 Molekularmassenstandards.....	8
1.3 Primäre Antikörper.....	8
1.4 Sekundäre Antikörper.....	8
1.5 Reaktionskits.....	8
1.6 Enzyme und Vektoren.....	9
1.7 PCR-Primer und Oligonukleotidsonden.....	9
1.8 Gase.....	10
1.9 Verbrauchsmaterial.....	10
1.10 Geräte.....	11
1.11 Material für Aufwuchsversuche.....	12
2. Kulturmedien und Kulturbedingungen	13
2.1 Medien.....	13
2.1.1 Luria-Bertani-Medium (LB-Medium).....	13
2.1.2 Modifiziertes ½ SME-Medium für <i>P. furiosus</i> und <i>P. woesei</i>	13
2.2 Herstellung.....	13
2.2.1 Aerobe Medien.....	13
2.2.2 Anaerobe Medien.....	13
2.2.3 Anaerobe Gelriteplatten.....	14
3. Verwendete Organismen und deren Kultivierung	14
3.1 Stämme.....	14
3.2 Routinemäßige Kultivierung.....	14
3.3 Kultivierung im Großmaßstab.....	15
4. Sterilisation	15
5. Mikroskopie	16
5.1 Phasenkontrast- und Fluoreszenzmikroskopie.....	16
5.1.1 Lichtmikroskopie.....	16
5.1.2 (Hochtemperatur-) Phasenkontrast- und Fluoreszenzmikroskopie... ..	16
5.1.3 Mikroskopie in Kapillaren.....	16
5.1.4 Bestimmung von Zellzahlen.....	17
5.1.5 Fluoreszenzfärbungen.....	17
5.1.5.1 DAPI-Färbung.....	17
5.1.5.2 Calcofluor-Färbung (Fluorescence Brightener 28).....	17
5.1.5.3 (An)Aerobe Alexafluor-Färbung.....	17
5.2 Rasterelektronenmikroskopie.....	18
5.3 Transmissionselektronenmikroskopie.....	18
5.3.1 Herstellung und Kontrastierung von Suspensionspräparaten.....	18
5.3.2 Gefrierätzung.....	19
5.3.3 Tomographie.....	19
5.3.4 Bildverarbeitung elektronenmikroskopischer Daten.....	20
6. Molekulargenetische Methoden	20
6.1 Isolierung von Nukleinsäuren.....	20
6.1.1 Puffer und Lösungen.....	20
6.1.2 DNA-Isolierung.....	20
6.1.3 Gesamt-RNA-Isolierung.....	21
6.2 Quantifizierung von Nukleinsäuren.....	21
6.2.1 Photometrische Konzentrationsbestimmung.....	21
6.2.2 Konzentrationsbestimmung mittels Ethidiumbromidplatten.....	22
6.3 Agarose-Gelelektrophorese.....	22
6.3.1 Puffer und Lösungen.....	22

6.3.2 Native Agarose-Gelelektrophorese.....	23
6.3.3 Denaturierende Agarose-Gelelektrophorese.....	23
6.4 Reinigung von DNA aus Agarosegelen.....	23
6.5 Autoradiographie.....	23
6.6 Restriktionshydrolyse.....	24
6.7 Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR).....	24
6.7.1 Routine-PCR/Ganzzell-PCR (Kolonie-PCR).....	24
6.7.2 Reverse Transkriptions-PCR („RT-PCR“/cDNA-Synthese).....	25
6.7.3 Nachweis spezifischer mRNA-Transkripte mittels PCR.....	25
6.7.4 Aufreinigung von PCR-Produkten.....	27
6.7.5 Einführung von Restriktionsschnittstellen.....	27
6.7.6 Ligation von PCR-Produkten.....	28
6.8 Klonierung und Plasmidpräparation.....	28
6.8.1 Herstellung kompetenter Zellen.....	28
6.8.2 Elektroporation.....	28
6.8.3 Plasmidpräparation.....	28
6.8.4 Hinterlegung von Klonen.....	29
6.9 Sequenzierung von PCR-Produkten und Plasmid-DNA	29
6.10 Sequenzdatenanalyse.....	29
6.11 Nachweis spezifischer Transkripte in der Gesamt-RNA von <i>Pyrococcus furiosus</i>	30
6.11.1 Herstellung ³² P-markierter dsDNA-Sonden.....	30
6.11.2 Northern Blotting.....	30
6.11.2.1 Puffer und Lösungen.....	30
6.11.2.2 Durchführung.....	30
6.11.3 Hybridisierung mit radioaktiv markierten dsDNA-Sonden.....	31
6.11.3.1 Puffer und Lösungen.....	31
6.11.3.2 Durchführung.....	32
7. Proteinbiochemische Methoden.....	32
7.1 Zellaufschluss.....	32
7.2 Flagellenpräparation.....	33
7.2.1 Puffer und Lösungen.....	33
7.2.2 Präparation durch Abscheren.....	33
7.2.3 Präparation durch Phasentransition mittels Triton X-114.....	34
7.2.4 Präparation durch Zelllyse mittels Triton X-100.....	34
7.3 Zellhüllenpräparation.....	34
7.4 Proteinreinigung.....	35
7.4.1 CsCl-Dichtegradienten-Zentrifugation.....	35
7.4.2 Dialyse.....	35
7.4.2.1 Puffer und Lösungen.....	35
7.4.2.2 Vorbereitung der Dialyseschläuche.....	35
7.4.2.3 Durchführung.....	35
7.4.3 Säulenchromatographische Reinigung.....	36
7.5 Heterologe Genexpression.....	36
7.6 Reinigung rekombinanter Proteine aus <i>E. coli</i>	37
7.6.1 Puffer und Lösungen.....	37
7.6.2 Durchführung.....	37
7.7 Analyse von Proteinlösungen.....	38
7.7.1 Proteinmengenbestimmung.....	38
7.7.2 SDS-PAGE (SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese).....	38
7.7.2.1 SDS-Polyacrylamidgele.....	39
7.7.2.2 SDS-PAGE nach Lämmli.....	39
7.7.2.3 SDS-PAGE nach Schagger und von Jagow.....	39
7.7.2.3 Coomassie-Färbung.....	40
7.7.2.4 Silberfärbung.....	40
7.7.2.5 Periodat-Schiff-Färbung (PAS-Färbung).....	41

7.7.2.6 Trocknung von Gelen.....	41
7.8 Western Blot.....	41
7.8.1 Transfer der Proteine auf eine PVDF-Membran.....	41
7.8.2 Coomassie-Färbung von Western Blots.....	42
7.8.3 Ponceau S-Färbung.....	42
7.9 Sequenzierung von Proteinen mittels Edman-Abbau.....	42
8. Immunologische Methoden.....	43
8.1 Produktion von spezifischen (primären) Antikörpern.....	43
8.2 Antikörper-Affinitätsreinigung.....	43
8.3 Puffer und Lösungen.....	44
8.4 Immuno-Blot.....	45
8.5 Immunmarkierung für die Fluoreszenzmikroskopie.....	45
8.5.1 Immunmarkierung an Aufwuchspräparaten.....	45
8.5.2 Immunmarkierung von Flagellen aus Flüssigkulturen.....	46
8.6 Immunmarkierung für die Elektronenmikroskopie.....	46
8.6.1 Transmissionselektronenmikroskop.....	46
8.6.2 Rasterelektronenmikroskop.....	46
9. Physikalisch-biochemische Untersuchungen.....	47
9.1 Aufwuchs- und Anheftungsversuche.....	47
9.2 Untersuchungen zur Flagellenausbildung in verschiedenen Medien.....	47
9.3 Untersuchungen zur Stabilität der Flagellen.....	48
9.3.1 Einfluss des pH-Wertes.....	48
9.3.2 Einfluss von Salzen und Detergentien.....	48
9.3.3 Einfluss der Temperatur.....	49
10. Proteinsequenzdatenanalyse und Primerdesign.....	49
III. Ergebnisse.....	50
A) Charakterisierung der Zellanhänge.....	50
1. Strategien zur Isolierung.....	50
1.1 Abscheren der Flagellen.....	50
1.2 Solubilisierung mittels Triton X-100.....	53
1.3 Phasenseparierung mittels Triton X-114.....	53
2. Wachstumsversuche.....	54
3. Nachweis der Glykosylierung.....	57
4. Sequenzanalysen.....	57
4.1 Proteinsequenzierungen.....	57
4.2 Nachsequenzierung der genomischen DNA.....	60
4.3 Sequenzvergleiche und computergestützte Sekundärstrukturanalysen.....	61
5. Klonierung der (Struktur)Flagellen-Gene und deren Expression.....	63
6. Immunologische Untersuchungen.....	66
7. Biophysikalische Charakterisierung.....	68
7.1 Einfluss der Temperatur.....	69
7.2 Einfluss des pH-Wertes.....	70
7.3 Einfluss verschiedener Salze und Detergentien.....	71
8. Mikroskopie.....	72
8.1 Fluoreszenzmikroskopie.....	72
8.1.1 Färbung mit Alexafluor-Farbstoffen.....	72
8.1.2 Färbung mittels fluoreszenzgekoppelter Antikörper.....	72
8.2 Transmissionselektronenmikroskopie.....	73
8.2.1 Uranylacetatkontrastierung und Schwermetallbedampfung.....	73
8.2.2 Gefrierätzung.....	75
8.2.3 Immunmarkierung.....	78
8.2.4 Tomographie.....	80
8.3 Rasterelektronenmikroskopie.....	81
8.3.1 Gefrierbruch.....	81
8.3.2 Immunmarkierung.....	82
9. Schwimmverhalten und Aufwuchsversuche.....	82

9.1 Schwimmverhalten im Temperaturgradient.....	82
9.2 Aufwuchsversuche.....	83
9.2.1 Fluoreszenzmikroskopische Analyse.....	84
9.2.2 Elektronenmikroskopische Analyse.....	85
9.2.2.1 Transmissionselektronenmikroskop.....	85
9.2.2.2 Rasterelektronenmikroskop.....	86
9.2.3 Immunologische Versuchsvarianten – Ablösen aufgewachsener Zellen mit Antikörpern.....	88
9.2.3.1 Fluoreszenzmikroskop.....	88
9.2.3.2 Elektronenmikroskopie.....	89
9.2.4 Gelriteplatten.....	90
B) Nachweis spezifischer Transkripte des <i>fla</i>-Genclusters.....	91
1. Das <i>fla</i>-Gencluster.....	92
2. Analyse des wachstumsabhängigen Expressionspools des <i>fla</i>-Genclusters.....	93
2.1 Nachweis mittels RT-PCR.....	93
2.2 Versuch des Nachweises spezifischer Transkripte mittels Northern Blotting und ³² P-Markierung.....	95
2.3 Transkriptkarte des <i>fla</i> -Genclusters.....	95
IV. Diskussion.....	98
1. Die Flagelle von <i>P. furiosus</i> wird aus Flagellinen aufgebaut und glykosyliert.....	98
2. Funktionsvariabilität der Flagellen von <i>P. furiosus</i>: Fortbewegung, Zell-Zell- Verbindungen und gezielte Anheftung.....	102
2.1 Struktur.....	104
2.2 Zell-Zell-Verbindungen.....	105
2.3 Anheftung.....	105
3. Die <i>fla</i>-Gene sind in einem Cluster angeordnet.....	108
3.1 Flagellengene.....	109
3.2 Akzessorische Flagellengene.....	110
4. Das Operon – Untersuchungen zur Kotranskription.....	112
V. Zusammenfassung.....	118
VI. Abkürzungsverzeichnis.....	119
VII. Anhang.....	121
VIII. Literaturverzeichnis.....	132

I. Einleitung

"Die Mikrobe ist so klein, sie wird nie gesehen sein", schrieb einst Hilaire Belloc¹, obwohl die Erfindung des Mikroskops eine Beobachtung der Mikroorganismen schon lange ermöglichte. Gerade weil Bakterien so winzig sind, fiel es lange schwer zu glauben, welche großartigen Fähigkeiten sie besitzen. Doch Erkenntnisse über Mikroorganismen sorgen immer wieder für Überraschungen. Eine der erstaunlichsten Entdeckungen war hierbei die bakterielle Geißel. Sie stellt, neben den Spermien, die einzige bekannte Form rotierender Organellen in der Natur dar und befähigt Mikroorganismen zu einer gerichteten Bewegung, der Taxis (Berg *et al.*, 1973; Silverman *et al.*, 1974; Denehy *et al.*, 1971). Diese beiden Tatsachen erfordern die Verknüpfung einer äußerst komplexen Struktur mit einem ausgefeilten Sensorik- und Regulationssystem. Der Antrieb ist dabei in der Zellmembran lokalisiert und stellt eine Art "Nano-Motor" dar. Dieser wird in den meisten Fällen durch Protonen angetrieben. Die Taxis befähigt die Organismen zur gerichteten Bewegung in ihrem Lebensraum als Reaktion auf bestimmte Reize. Als modulierende Komponenten können vielerlei Substanzen wirken und somit zu verschiedensten Formen der Taxis führen, wie z.B. Aerotaxis, Chemotaxis, Osmotaxis, Phototaxis, Thermotaxis etc. Die Evolution und verschiedenste Anforderungen an die Umwelt führten zur Ausprägung zahlreicher Organellen und Motilitätsformen. Neben der bereits oben erwähnten bakteriellen Geißel, gibt es eine Vielzahl weiterer Umsetzungen in der Natur zur Generierung von Motilität. Die archaeele Flagelle zum Schwimmen, bakterielle Typ IV Pili für die "twitching motility" (Mattick *et al.*, 1995), eine "ratchet"-Struktur die Bakterien der *Cytophaga-Flavobacterium*-Gruppe zum Gleiten dient (McBride, 2001), der "junctional pore complex", der durch Ausscheidung von Schleim Cyanobakterien und Myxobakterien ebenfalls zum Gleiten befähigt (Wolgemuth *et al.*, 2002; Hoiczky *et al.*, 1998), ein kontraktiles Cytoskelett bei *Spiroplasma melliferum* (Trachtenberg *et al.*, 2001) oder periplasmatische Flagellen der Spirochaeten (Li *et al.*, 2000 a und b; Motaleb *et al.*, 2000). Diese variablen Fortbewegungs-Formen befähigen die Organismen dazu, zahlreiche Lebensräume aufzusuchen und sich dort zu etablieren. Dabei findet eine Besiedlung in nahezu allen bekannten Habitaten statt. Die Zellen leben in Populationen, in denen sie sich vermehren, wobei diese nur in den seltensten Fällen als "Reinkulturen" anzutreffen sind. Verschiedenste Populationen leben in einem Habitat in gemischten mikrobiellen Gemeinschaften miteinander. Die Anzahl der Zellen oder der verfügbaren Komponenten innerhalb dieses Systems wird dabei durch die Nahrungsquellen oder die Umweltbedingungen beeinflusst. Die übergeordneten Strukturen die dabei ausgebildet werden können, werden als Biofilm bezeichnet. Biofilme entstehen an Grenzflächen und können in zahlreichen Formen vorkommen. Als Film auf Oberflächen, als dicke

¹ Hilaire Belloc: britischer Schriftsteller; 27. Juli 1870 – 16. Juli 1953

schleimartige Aggregate oder als "Flöckchen" frei schwimmend. Das Leben in einem Biofilm bietet entscheidende Vorteile, denn es gewährt Schutz vor der Außenwelt und eine optimale Nährstoffversorgung. Die Ausbildung einer EPS (Matrix aus extrazellulären polymeren Substanzen) stellt dabei einen zusätzlichen Schutzfaktor dar. Diese Schicht ist sehr heterogen in der Zusammensetzung und kann neben einem hohen Anteil von Wasser auch Polysaccharide, (Glyco)Proteine, (Phospho/Glyco)Lipide oder Nukleinsäuren enthalten (Flemming *et al.*, 2002). Die EPS bietet somit einen idealen Raum für einen Nährstoffaustausch und einen zusätzlichen Schutz vor Umwelteinflüssen.

Den initialen Schritt zur Etablierung in einem neuen Lebensraum stellt die Adhäsion dar. Der als Primärbesiedler bezeichnete zuerst anhaftende Mikroorganismus bietet eine Plattform für eine nachfolgende Adhäsion von weiteren Organismen, dann als Zweitbesiedler bezeichnet. So wird durch Anheftung und Zellteilung nach und nach ein Biofilm ausgebildet. Ein Biofilm stellt im Grunde ein dynamisches System dar, denn neben der Besiedlung und der Zellteilung können Zellen sich auch wieder aus dem Verband lösen, unter anderem um in neue Habitate zu gelangen und diese zu besiedeln (Flemming *et al.*, 2001).

Wie bereits erwähnt spielt die Adhäsion eine entscheidende Rolle um sich in einem neuen Lebensraum etablieren zu können. Hierfür werden sehr oft Zellanhänge genutzt (Flagellen/Geißeln oder Pili), diese sind aber nicht in jedem Fall zwingend notwendig. Die ausführlichsten Untersuchungen wurden an *Pseudomonas aeruginosa* durchgeführt (Flemming *et al.*, 2001). *P. aeruginosa* erhält durch die Typ IV Pili die Befähigung, sich aktiv auf Oberflächen fortzubewegen. Diese Motilität wird twitching motility genannt (Mattick *et al.*, 1995), da sie ähnlich dem Auswerfen eines Ankers, aus einem "Auswerfen" der Pili besteht, welche dann an der Oberfläche adhären und anschließend ruckartig durch eine Retraktion des Pilus "eingeholt" werden (Bradley, 1980).

Daten über die Ausbildung von Biofilmen bei Archaeen sind nur sehr spärlich vorhanden. Einige Erkenntnisse konnten durch Untersuchungen von Laborkulturen gewonnen werden. Ein Beispiel stellt hier die stressinduzierte Biofilm-Bildung bei *Archaeoglobus fulgidus* dar (LaPaglia *et al.*, 1997). Durch Kombination mehrerer Stressfaktoren kommt es zur Ausbildung eines Biofilms in Verbindung mit dem Ausschleusen von extrazellulären polymeren Substanzen. Die Zellen erhöhen so ihre Überlebenschancen (LaPaglia *et al.*, 1997). Ähnliche Effekte wurden auch von weiteren Archaeen, wie *Archaeoglobus profundus*, *Methanococcus janaschii* und *Methanothermobacter thermoautotrophicus* (früher: *Methanobacterium thermoautotrophicum*) berichtet. Die gesammelten Erkenntnisse führten zu der Annahme, dass die Biofilmbildung auch unter Archaeen ein weit verbreitetes Phänomen darstellen könnte (LaPaglia *et al.*, 1997).

Einer der wenigen in der Natur beobachteten Biofilme stellt eine Kooperation von Bakterien mit Archaeen in kalten sulfidischen Gewässern des Islinger Mühlbaches dar (Rudolph *et al.*, 2001). Es handelt sich dabei um eine morphologisch mitunter mit bloßem Auge wahrnehmbare Struktur, welche die Form einer Perlenkette zeigt. Die einzelnen Perlen setzten sich dabei aus einer äußeren Schicht, in der sich filamentöse Bakterien der Gattung *Thiotrix* befinden (Moissl *et al.*, 2002) zusammen, im Inneren der Perle hingegen liegen die neuartigen kokkoiden SM1-Euryarchaeoten vor (Rudolph *et al.*, 2001). Die Interaktion, die zur Ausbildung einer Kugelform führt, wird hier wahrscheinlich von einer vollkommen neuartigen Struktur des SM1 Archaeums vermittelt. Es handelt sich um Zellanhänge die eine stacheldrahtähnliche Struktur aufweisen. An deren Ende befindet sich eine Struktur, die einem Angelhaken ähnelt, weshalb die gesamte Struktur als Hamus bezeichnet wurde (Moissl *et al.*, 2003 und 2005). Innerhalb des untersuchten Biotops konnten jedoch auch schleimartige Biofilme gefunden werden, die ausschließlich aus dem beschriebenen SM1 Archaeum bestanden (Henneberger *et al.*, 2006). In den beiden beschriebenen Biofilmen führten die zahlreichen Hami zu einer dichten Vernetzung der Zellen miteinander. Es wird angenommen, dass die initiale Adhäsion auch hier durch die Zellanhänge, die Hami, vermittelt werden könnte.

Unter diesen Voraussetzungen ist es natürlich von großem Interesse, die archaeellen Zellanhänge genauer zu untersuchen. Die ausführlichsten Untersuchungen erfolgten dabei bislang für die archaeelle Flagelle, da sie nach dem gängigen Verständnis für die Fortbewegung der Archaeen genutzt wird.

Interessanterweise scheint die archaeelle Flagelle selbst weniger der bakteriellen Geißel zu entsprechen, sondern viel mehr den bakteriellen Typ IV Pili, die für die oben beschriebene twitching motility verantwortlich sind (Bardy *et al.*, 2004; Bardy *et al.*, 2003b; Cohen-Krausz *et al.*, 2002; Peabody *et al.*, 2003; Thomas *et al.*, 2001b). Betrachtet man den Aufbau der Flagelle, so wird schnell deutlich, dass der Assemblierungsmechanismus der archaeellen Flagelle vollkommen anders ablaufen muss, als im Fall der bakteriellen Geißel (Bardy *et al.*, 2003b). Die bakterielle Geißel besitzt einen Durchmesser von 20 nm und weist im Inneren einen ca. 2 nm messenden Kanal oder Hohlraum auf (Jones *et al.*, 1991). Dieser Hohlraum dient dem Transport neuer Untereinheiten nach außen zum Einbau in die Flagelle (Abb.1a). Die Verlängerung der bakteriellen Geißel geschieht also an der Spitze der Struktur. Die Geißel selbst wird dabei von einem einzigen Flagellin gebildet. Die Geißel steht über einen Haken mit dem Antriebsmechanismus, dem Basalkörper, in Verbindung. Der Basalkörper verankert über verschiedene Ringstrukturen die Geißel in der Cytoplasma-Membran (MS-Ring), in der Peptidoglykanschicht (P-Ring) und der äußeren Membran (L-Ring).

Archaeelle Flagellen sind wesentlich dünner und besitzen einen durchschnittlichen Durchmesser von 10 – 13 nm (Black *et al.*, 1979; Cruden *et al.*, 1989; Fedorov *et al.*, 1994; Jarrell *et al.*, 1989; Southam *et al.*, 1990). Tomographische Analysen der Flagelle von *Halobacterium salinarum* zeigten, dass dieses dünne Filament keinerlei zentralen Hohlraum aufweist (Cohen-Krausz *et al.*, 2002; Trachtenberg *et al.*, 2005). Dieser Befund legt nahe, dass die Assemblierung der archaeellen Flagelle wohl einen ähnlichen Polymerisations-Mechanismus wie die Typ IV Pili besitzt (Bardy *et al.*, 2003b). Hier werden die neuen Untereinheiten in tausendfacher Kopie an der Basis der Struktur eingebaut (Abb.1b). Ähnlich einem Haar schiebt sich der Pilus immer weiter nach außen. Über die Verankerungsstrukturen der archaeellen Flagelle kann noch sehr wenig ausgesagt werden. Der Fund knopfartiger Strukturen ließ jedoch vermuten, dass es sich hierbei um den Verankerungsmechanismus oder einen Teil davon handeln könnte (Kupper *et al.*, 1994; Bardy *et al.*, 2002a).

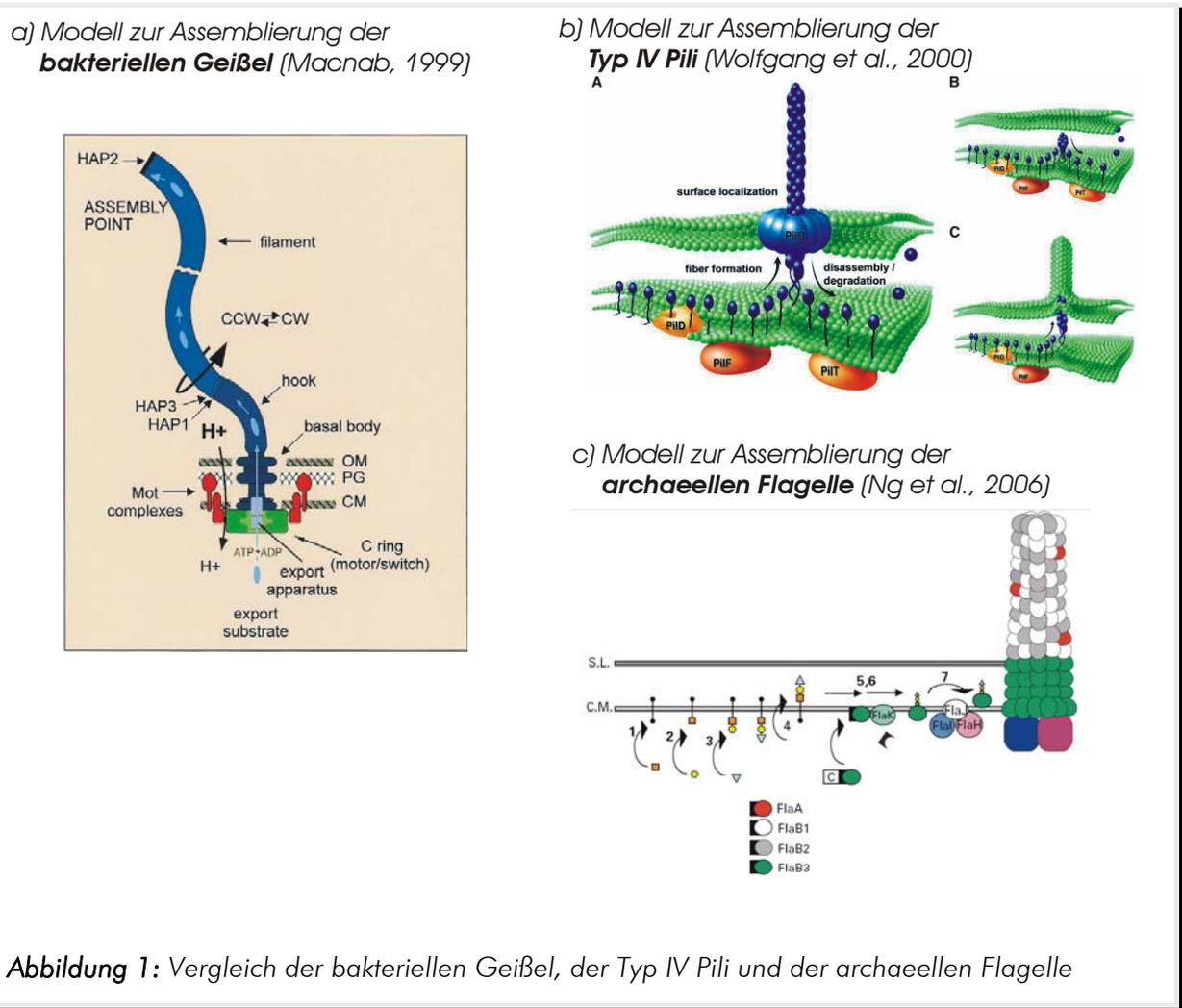


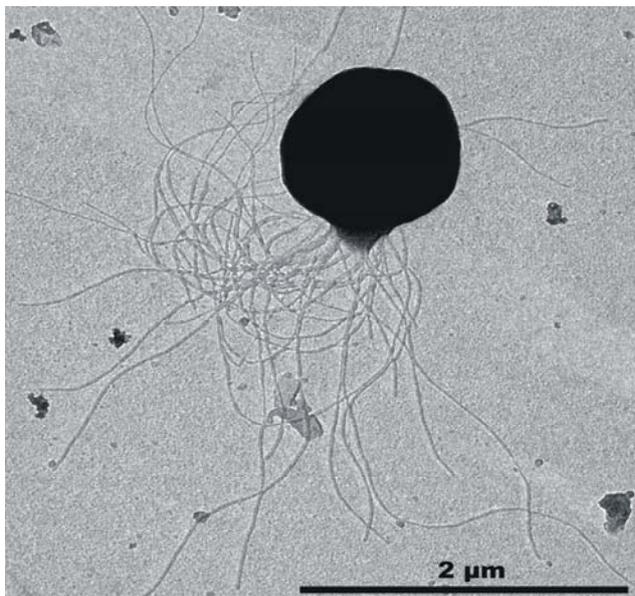
Abbildung 1: Vergleich der bakteriellen Geißel, der Typ IV Pili und der archaeellen Flagelle

Archaeelle Flagellen sind aus mehreren Flagellinen aufgebaut, die gewöhnlich posttranslational durch Glykosylierung modifiziert werden (Thomas *et al.*, 2001a; Bardy *et al.*, 2003b). Auch dies stellt die archaeellen Flagellen in die Nähe der Typ IV Pili, da einige Strukturpiline ebenfalls glykosyliert vorliegen können.

Die Flagellingene sind im Regelfall in Clustern im Genom angeordnet und werden unterschiedlich stark transkribiert (Gerl *et al.*, 1988; Ng *et al.*, 2000; Patenge *et al.*, 2001). Dies führt zu unterschiedlichen Anteilen der Flagellinproteine, die dann als Haupt (major)- und Neben (minor)-Flagelline bezeichnet werden. Sowohl Haupt- als auch Neben-Flagelline spielen eine wichtige Rolle beim Aufbau der Flagelle und sind nicht gegeneinander austauschbar (Bardy *et al.*, 2003b; Bardy *et al.*, 2004).

Die vergleichbaren Eigenschaften der archaeellen Flagelle und der Typ IV Pili ließen sich auch auf Proteinebene zeigen. Piline und Flagelline besitzen ein sehr ähnliches Signalpeptid am N-Terminus des Proteins (Faguy *et al.*, 1994a). Für dieses Signalpeptid konnte eine Konsensussequenz festgelegt werden, welche inzwischen als typisches Einordnungsmerkmal für Flagelline und Piline dient (Faguy *et al.*, 1994a).

Abbildung 2: *Pyrococcus furiosus*



Innerhalb der Archaeen stellt *Pyrococcus furiosus* zunehmend eine Art Modellorganismus der Archaeenforscher dar. Der Mikroorganismus wurde aus geothermal aufgeheizten marinen Sedimenten am Strand von Porto di Levante vor der italienischen Insel Vulcano isoliert (Fiala *et al.*, 1986). Die Gattung *Pyrococcus* entspringt sehr nahe an der Wurzel des phylogenetischen Stammbaumes und bildet zusammen mit der Gattung

Thermococcus die Familie der *Thermococcaceae*, die innerhalb der Ordnung der *Thermococcales* zu finden ist.

P. furiosus stellt eine 0,8 – 2,5 µm große, strikt anaerob und heterotroph lebende Kokke dar. Der optimale pH-Wert liegt dabei im neutralen Bereich bei einem pH-Wert von ca. 6,5 – 7. Bei einem Wachstumsoptimum von 100°C werden unter idealen Bedingungen lediglich 37 Minuten für eine Verdopplung benötigt. Zudem kann *P. furiosus* zu sehr hohen Zellzahlen und Zellmassen angezogen werden (Verhagen *et al.*, 2001). Die Verfügbarkeit des Genoms (Robb *et al.*, 2001) trägt ebenso zur regen Forschung an diesem Organismus bei, wie die

Erkenntnisse auf genomischer, physiologischer und molekularer Ebene, was bis zum heutigen Tag alleine 770 Veröffentlichungen in PubMed nach sich zog.

P. furiosus besitzt 50 monopolar inserierte Flagellen (Fiala *et al.*, 1986). Die Namensgebung "*Pyrococcus furiosus*", die rasende Feuerkugel, spricht dabei für sich. Ob die Flagellen jedoch tatsächlich mit der Motilität in Zusammenhang stehen, wurde bislang nicht direkt gezeigt. In Anbetracht der hohen Anzahl an Flagellen stellt sich die Frage, wie eine koordinierte Motilität ermöglicht wird.

Im Rahmen dieser Arbeit sollten vertiefte Erkenntnisse über die Flagellen des hyperthermophilen Archaeums *Pyrococcus furiosus* gewonnen werden. Von Interesse war dabei nicht nur der Aufbau der Flagellen selbst, sondern auch die Verankerung der Flagelle. Im Verlauf der Arbeit konnten den Zellanhängen von *P. furiosus* neuartige Funktionen zugeordnet werden. Genetische Analysen sollten darüber hinaus Aufschluss über den Ablauf der Assemblierung der Flagelle geben.

II. Material und Methoden

1. Bezugsquellen

1.1 Chemikalien und Biochemikalien

Chemikalie	Bezugsquelle
Acrylamid (37,5:1) 30%	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe
Agar	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg
peqGold Universal-Agarose, RNase-frei	PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen
Agarose	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe
AlexaFluor 488 und 555	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Ampicillin, Na-Salz	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg
APS (Ammoniumpersulfat)	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg
Bromphenolblau	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg
BSA (Rinderserumalbumin)	New England Biolabs GmbH, Frankfurt
Cäsiumchlorid	Biomol GmbH, Hamburg
Chloramphenicol	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg
Coomassie Brilliant Blue G250	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg
CTAB (Cetyltrimethylammoniumchlorid)	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg
DEPC (Diethylpyrocarbonat)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
DMSO (Dimethylsulfoxid)	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg
DAPI (4,6 Diamidino-2-Phenylindol)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
DNA aus Heringssperma	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
DTT (Dithiothreitol)	ICN Biomedicals GmbH, Eschwege
EDTA, Na ₂ -Salz (Ethyldiamintetraessigsäure)	ICN Biomedicals GmbH, Eschwege
Ethanol p.a.	Mallinckrodt Baker, Griesheim
Ethidiumbromid	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg
Ficoll 400	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Glutardialdehyd	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Glycerin	ICN Biomedicals GmbH, Eschwege
Hefeextrakt	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg
HEPES	ICN Biomedicals GmbH, Eschwege
Imidazol	Biomol GmbH, Hamburg
IPTG (Isopropyl- β -D-Thiogalactosid)	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg
Magermilchpulver	Milchwerke Regensburg eG, Regensburg
Methanol p.a.	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
MOPS (3-Morpholinopropansulfonsäure)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Natriumcarbonat	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe
Natriumdisulfit	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Natriumsulfid	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Natriumthiosulfat	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Pepton	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Periodsäure	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Phenol	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe
PCI (Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol; 25:24:1)	Biomol GmbH, Hamburg
PMSF (Phenylmethylsulfonylfluorid)	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg
Resazurin	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg
Saccharose	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Sepharose 2B	Pharmacia Fine Chemicals AB, Uppsala (S)
Schiffs Reagenz	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe
Silbernitrat	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe
TEMED (N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin)	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe
Tris (Tris(hydroxymethyl)aminomethan)	USB Europe GmbH, Staufen
Trizol	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Triton X-100	ICN Biomedicals GmbH, Eschwege

Triton X-114	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Tween 20	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg
UltraPure H ₂ O, RNase-frei	GIBCO (Invitrogen GmbH), Karlsruhe
Uranylacetat	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen

Tabelle 1: Bezugsquellen der Chemikalien und Biochemikalien

Alle sonstigen verwendeten Substanzen und Chemikalien wurden von VWR International GmbH, Darmstadt bezogen. Der Reinheitsgrad betrug, sofern nicht anders angegeben, immer p.a..

1.2 Molekularmassenstandards

Molekularmassen-Standard	Bezugsquelle
DNA Marker I for Genomic DNA Analysis	Fermentas GmbH, St. Leon-Rot
GeneRuler, 1 kb DNA ladder, ready-to-use	Fermentas GmbH, St. Leon-Rot
Protein Marker, Broad Range	New England Biolabs GmbH, Frankfurt
Prestained Protein Marker, Broad Range	New England Biolabs GmbH, Frankfurt
RNA Ladder, High Range	Fermentas GmbH, St. Leon-Rot
ssRNA Ladder	New England Biolabs GmbH, Frankfurt

Tabelle 2: Bezugsquellen der Molekularmassenstandards

1.3 Primäre Antikörper

Antikörper	erzeugt in	Hersteller
Anti-'FlaB0'	Kaninchen	Davids Biotechnologie, Regensburg
Anti-'FlaB1'	Kaninchen	Davids Biotechnologie, Regensburg
Anti-'FlaB2' - MT	Kaninchen	Davids Biotechnologie, Regensburg
Anti-'FlaB2' - CT	Kaninchen	Davids Biotechnologie, Regensburg
Anti-Fla Pfu	Kaninchen	Davids Biotechnologie, Regensburg
Anti-Pol UE D	Kaninchen	Eurogentec GmbH Deutschland, Köln

Tabelle 3: Bezugsquellen der primären Antikörper

1.4 Sekundäre Antikörper

Antikörper	gekoppelt mit	erzeugt in	Hersteller
Anti-rabbit IgG (whole molecule)	Peroxidase	Ziege	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Anti-rabbit IgG (whole molecule)	6 nm Gold	Ziege	Aurion Co., Wageningen (NL)
Anti-rabbit IgG (whole molecule)	10 nm Gold	Ziege	Aurion Co., Wageningen (NL)
Anti-rabbit IgG (whole molecule)	AF 488	Ziege	Invitrogen GmbH, Karlsruhe

Tabelle 4: Bezugsquellen der sekundären Antikörper

1.5 Reaktionskits

Reaktionskit	Hersteller
Expand Long Range, dNTPack	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Expand Long Template PCR System	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
E.Z.N.A. [®] Plasmid Miniprep Kit I	PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen
Fast Start GC-rich PCR System	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Fast Start High Fidelity PCR System	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
GeneJET™ Plasmid Miniprep Kit	Fermentas GmbH, St. Leon-Rot
Megaprime™ DNA Labelling Systems	GE Healthcare, München
MinElute PCR Purification Kit	QIAGEN GmbH, Hilden
Protino Ni-TED 2000	Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, Düren

QIAEX II Gel Extraction Kit	QIAGEN GmbH, Hilden
QIAquick PCR Purification Kit	QIAGEN GmbH, Hilden
RNase-free DNase-Set	QIAGEN GmbH, Hilden
Taq PCR Master Mix Kit	QIAGEN GmbH, Hilden

Tabelle 5: Bezugsquellen der Reaktionskits

1.6 Enzyme und Vektoren

Enzyme und Reaktionspuffer	Hersteller
Chymotrypsin	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
DNase, RNase-frei	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Lysozym	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Proteinase K	VWR International GmbH, Darmstadt
RNase	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Super Script II Reverse Transkriptase	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
T4 Ligase	New England Biolabs GmbH, Frankfurt
Trypsin	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim

Tabelle 6: Bezugsquellen von Enzymen

1.7 PCR-Primer und Oligonukleotidsonden

Alle verwendeten Primer und Oligonukleotidsonden wurden von der Firma Metabion GmbH, Martinsried, synthetisiert.

Bezeichnung	Sequenz (5' → 3')	Verwendung
B1_f	CGTGTGGCTATATAAACGCC	NH
B1_r	TTCCATTCTTGCTCTTATAATTAAGA	NH
Ecoli GAPDH 1_f	ATGACTATCAAAGTAGGTATCAACGGT	NH
Ecoli GAPDH 996_r	TTATTTGGAGATGTGAGCGATC	NH
FlaB0 cut_f	GGATCCGAGAAAACAGCATATCACAAAGGA	GK
FlaB0 cut_r	AAGCTTACCGAAAACCTCCATTTCCCT	GK
FlaB1 cut_f	GGATCCAGTGGAGAAGTGTACACTGGAAAGA	GK
FlaB1 cut_r	AAGCTTGCTCTTATAATTAAGACATCATCCGT	GK
HTH_f	GTGCCACCAATAATCGACC	NH
HTH_r	TTACAACCTTTTCAATGAGAAGAATTGC	NH
Methyltrans_r	TTACAACCTTTTCAATGAGAAGAATTGC	NH
PFLAB-17_f	ATATCATATGATGCAGTGGAGGAGAAAATGA	MS, GK
PFLAB+2n_r	AATCTCGAGTGCAGTGGCATAACAACCAC	MS, GK
PFLAB 241	GCTCCAAATGCAGGGACTAG	MS
PFLAB 529	AGCAAGCTACTCTTCGGGATT	MS
PFLAB 241_rk	CTACTCCCTGCATTTGGAGC	MS
PF0329_f	AGTAACAGTTATAGCACTCATTTGGGT	NH
PF0329_r	GCTGATCTACGAGTTCTGGAAAC	NH
PF0329/2_r	AACCTGCTGGCGGTAGTTAA	NH
Pfu flab0_f	GAACCCTTATAGTGTATTGCCAT	NH
Pfu flab0_r	AATACCCTTACCGAAAACCTCCATT	NH
Pfu fla1b_f	CGACACTGTTGCACTGCTTC	NH
Pfu fla1b_r	CACTGCAGTTCTATCACATTATACTCA	NH
Pfu fla1bm_f	TGGATATTTGCAGCAGAAGG	NH
Pfu flab1bm_r	TCATTGAAGTTCCATTAAGTTTTGG	NH
Pfu fla1c_f	ATGCCACTCGACTTCCTTTC	NH
Pfu fla1c_r	ATGTTGTCAATGCTTATCTTTATCC	NH
Pfu fla1d_f	GGATTCCTTAACCCCTAGACAA	NH
Pfu fla1d_r	GCTATTCAATCCTGGCTTTG	NH
Pfu fla1f_f	GTATGCAGCATGGGACAGTG	NH

Pfu fla1f_r	TTTGGAAGTAGTCCCCAGGT	NH
Pfu fla1g_f	AGTACGGTTGCTGGAGCATT	NH
Pfu fla1g_r	GAACAACGACGATTCTGTGTG	NH
Pfu fla1h_f	GCAAGCTATGTTTCAAGCCAAT	NH
Pfu fla1h_r	CCACCTTGGGTTGCGACTCTA	NH
Pfu flai_f	CACTTGAAGATGCCATGAGAAG	NH
Pfu flai_r	TGTCCCCATGCAACTAACT	NH
Pfu flaj_f	GGCAGACATAGACCCCAAAG	NH
Pfu flaj_r	CCAACCTCAGCTGCCAAGAT	NH
Pfu met_f	AATATTAGATGAGGGATTGGAAGTTAA	NH
Pfu met_r	TATTGCCATCTTAACTATGGTCCC	NH
Pfu pk 1_f	GTGAGAAGGGTGAAGCTCCC	NH, MS
Pfu pk 1434_r	TCAAGCTATTTGGAATATCTTAATTGA	NH, MS
pQE30_f	CCCGAAAAGTGCCACCTG	MS
pQE30_r	GTTCTGAGGTCATTACTGG	MS
Seq41 353420_f	ATGGAAAAGTAGAGAAGACCGTTG	NH, MS
Seq541 352920_f	TGGCTCAGCTTACCAGC	MS
Seq919 352542_f	AATATTAGATGAGGGATTGGAAGTTAA	MS
Seq1302 352159_r	TATTGCCATCTTAACTATGGTCCC	MS
Seq1700 351761_r	ATCACATTATACTCAAATGTTGGGG	MS

Tabelle 7: Zusammenstellung der verwendeten Primer

NH= Northern Hybridisierung; MS= Manuelle Sequenzierung; GK= Genklonierung

1.8 Gase

Alle Gase wurden von der Firma Linde AG, Geschäftsbereich Linde Gas, Pullach, bezogen.

1.9 Verbrauchsmaterial

Verbrauchsmaterial	Bezugsquelle
Aluminiumkappen (20 mm, ohne Septum)	WICOM GmbH, Heppenheim
Deckgläser für Mikroskopie, 20 x 20 mm	Paul Marienfeld GmbH & Co. KG, Lauda-Königshofen
Dialyseschläuche ZelluTrans	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe
DryEase™ Mini Cellophane	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Einmalkanülen	Terumo Europe N.V., Leuven (B)
Einmalskalpelle	VWR International GmbH, Darmstadt
Einmalspritzen 1 ml	CODAN Medical ApS, Rødby (DK)
Einmalspritzen 5 ml, 10 ml, 20 ml	B. Braun Melsungen AG, Melsungen
Einwegpasteurpipetten 2,5 ml, weite Öffnung	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe
Eppendorf-Reaktionsgefäße (1,5 und 2,0 ml)	Eppendorf AG, Hamburg; Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe
Filterpapier Whatman 3MM	Whatman Biometra GmbH, Göttingen
Glaskapillaren (Sodaklarglas), Enden offen	Hilgenberg GmbH, Malsfeld
Gummistopfen	Deutsch & Neumann GmbH, Berlin
Immersionsöl	Carl Zeiss AG, Oberkochen
kontaminationsfreie Aerosolfilter Pipettenspitzen	PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen
Nylonmembran Hybond N ⁺	GE Healthcare, München
Objektträger	Paul Marienfeld GmbH & Co. KG, Lauda-Königshofen
Parafilm „M“ [®] Laboratory Film	American National Can™, Chicago (USA)
Pasteurpipetten	Brand GmbH & Co. KG, Wertheim
PCR-Reaktionsgefäße (0,2 ml)	PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen
pH-Indikatorstäbchen	VWR International GmbH, Darmstadt
Pipettenspitzen	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
Plastikpetrischalen	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
PVDF-Membran Immobilon - P ⁵⁰	Millipore GmbH, Schwalbach

Rundfilter 90 mm, 110 mm	Schleicher & Schuell GmbH, Dassel
Schraubdeckelgefäße (Falcon Tube™), 15 und 50 ml	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe
Sterilfilter (0,22 mm Porenweite)	Pall GmbH, Dreieich
Trägernetzchen für Elektronenmikroskopie Kupfernetzchen (G200, G400, Hex600, G100x400) Goldnetzchen (G200, G400) Nickelnetzchen (400 mesh) Titannetzchen (300 mesh)	Plano GmbH, Wetzlar TAAB Laboratories Equipment Ltd., Berkshire (GB) Plano GmbH, Wetzlar Plano GmbH, Wetzlar
Zahnstoßer	Fackelmann GmbH & Co. KG, Hersbruck

Tabelle 8: Bezugsquellen des Verbrauchsmaterials

1.10 Geräte

Gerät	Bezugsquelle
Anaerobenkammer	COY Laboratory Products Inc., Ann Arbor (USA)
Blockthermostat Thermomixer compact 5350	Eppendorf AG, Hamburg
Dispensette	Brand GmbH & Co. KG, Wertheim
DryEase™ Mini - Geltrocknungssystem	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Econo Chromatographie System	Biorad Laboratories GmbH, München
Elektroporationsapparatur GenePulser II	Biorad Laboratories GmbH, München
GeneAmp® PCR System 9600	Perkin Elmer Cetus, Norfolk, USA
GS Genelinker UV Chamber	Biorad Laboratories GmbH, München
Gyrotory Water Bath Shaker, Model G76	New Brunswick Scientific Co., New Brunswick, USA
Magnetrührer MR3002	Heidolph GmbH & Co. KG, Kehlheim
Minigel-Twin-Apparatur	Whatman Biometra GmbH, Göttingen
NanoDrop ND-100 Spectrophotometer	NanoDrop Technologies, Wilmington (USA)
pH-Meter	WTW GmbH, Weilheim
SANOclav („Autoklav“)	Wolf SANOclav, Geislingen
Schütteltisch	IKA Werke GmbH & Co. KG, Staufen
Spektralphotometer Genesys 5	Milton Roy Europe, Pont Saint Pierre (F)
Spektralphotometer HeLiOs γ	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA
ST305 (Spannungsquelle für die Elektrophorese)	Invitrogen GmbH (GIBCO), Karlsruhe
Sterilbank Microflow Biological Safety Cabinet	Thermo Fisher Scientific Inc. (Nunc), Waltham (USA)
Thomazählkammer	Brand GmbH & Co. KG, Wertheim
Tissue Culture Roller Drum, Model TC7	New Brunswick Scientific, New Brunswick, USA
Trans Blot SD Semi Dry Transfer Cell	Biorad Laboratories GmbH, München
Turbo Blotter™ Apparatur	Whatman Biometra GmbH, Göttingen
Ultraschall Desintegrator Sonifier 250	Branson Ultrasonic Corp., Danbury (USA)
UV-Schirm	Herolab GmbH, Wiesloch
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
Inkubatoren: Heraeus Typ T6 und Typ B12 Hybridisierungssofen Hybridizer HB1000 Memmert Typ ULE 700 Mytron WB 120	Heraeus Holding GmbH, Hanau PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen Memmert GmbH & CO. KG, Schwabach Mytron Bio-und Solartechnik GmbH, Heiligenstadt
Kameras: EasyStore Imaging System Nikon Coolpix 950 und 995 PixelFly CCD Kamera PCO.1600	Herolab GmbH, Wiesloch Nikon GmbH, Düsseldorf PCO AG, Kehlheim
Lichtmikroskope: Nikon Labophot Olympus BX 50	Nikon GmbH, Düsseldorf Olympus Optical Co. GmbH, Hamburg
Zentrifugen: Biofuge 13 (Rotor 3757)	Heraeus Holding GmbH, Hanau

Biofuge 28 RS – Heraeus Sepatech Centrifuge 5402 (Rotor F45-18-11) Labofuge GL (Rotor 2150) Optima™ LE-80K Ultrazentrifuge (Rotoren 60Ti, 70-Ti, SW-60) Sorvall® RC 5C Plus (Rotoren GSA, GS-3, SS-34) Vakuumentrifuge DNAmiri	Heraeus Holding GmbH, Hanau Eppendorf AG, Hamburg Heraeus Holding GmbH, Hanau Beckman Coulter GmbH, Krefeld Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham (USA) Heto-Holten A/S, Allerød (DK)
---	---

Tabelle 9: Bezugsquellen der Geräte

1.11 Materialien für Aufwuchsversuche

Material	Bestandteile, falls bekannt	Bezugsquelle
Aluminium (Alufolie)	Al-Gehalt mind. 99%; nicht bis schwach legiertes Aluminium	diverse
Emaile (beschichteter Stahl)	23% Borax, 52% Feldspat, 5% Flussspat, 5% Quarz, 5% Soda, 2,5% Natriumnitrat, je 0,5 bis 1,5% Cobalt-, Mangan- und Nickeloxid und 6,5% Kryolith; weiterhin 6 bis 10% Trübungsmittel (Zinnoxid, Titansilikate, Antimontrioxid) und Farboxide	Materialprobestück Pfaudler Werke GmbH, Schwetzingen
Glas (Deckgläschen)	Borsilikatglas der 1. hydrolytischen Klasse; DIN ISO 8255	Paul Marienfeld GmbH & Co. KG, Lauda-Königshofen
Glimmer	Chemische Bestandteile (u.a.) in veränderlichen Anteilen: SiO ₂ , AlO ₃ , Fe ₂ O ₃ , K ₂ O, MgO, H ₂ O, Spuren von F	BAL-TEC GmbH, Witten
Gold (Trägernetzchen)		TAAB Laboratories Equipment Ltd., Berkshire (GB)
Holz (Zahnstocher)		Fackelmann GmbH & Co. KG, Hersbruck
Kupfer (Trägernetzchen)		Plano GmbH, Wetzlar
Nickel (Trägernetzchen)		Plano GmbH, Wetzlar
Nylon (Strumpfhosen)	Lineare aliphatische Polyamide mit dem patentierten Handelsnamen Nylon; Färbung mit verschiedensten Substanzen (z.B. Säure-, Metallkomplex-, Dispers- oder Reaktivfarbstoffe)	diverse
PC	Synthetisches Polymer	Makrolon®; Bayer AG, Leverkusen
PE	Entsteht durch Polymerisation von Ethen; PE-HD, schwach verzweigtes Polymer	Bezug über mechanische Werkstatt der Universität Regensburg
Plexiglas	Polymethylmethacrylat ; synthetischer, thermoplastischer Kunststoff	mechanische Werkstatt
PTFE	Polytetrafluorethylen	mechanische Werkstatt
PVC	Polyvinylchlorid; amorpher thermoplastischer Kunststoff	mechanische Werkstatt
Quarz (gesintert)	„Substrat Pro“; SiO ₂	Eheim GmbH GmbH & Co. KG; Deizisau
Sand vom Originalisolationsort von <i>P. furiosus</i>	Gereinigt mit Chromschwefelsäure	Originalprobe VC1 genommen vor Porto di Levante, Vulcano (I)
Si-Wafer	Polykristallines Silizium	Infineon Technologies AG, Regensburg
Stahl	Hauptbestandteil Fe, genauer als Legierung aus Eisen und Eisenkarbid Fe ₃ C bezeichnet, wobei der Gesamtkohlenstoff-Anteil bei weniger als 2% liegt	mechanische Werkstatt
Styropor (=Polystyrol)	transparenter, amorpher oder teilkristalliner Thermoplast – Polymer	diverse
Titan (Trägernetzchen)		Plano GmbH, Wetzlar

Tabelle 10: Bezugsquellen der Aufwuchsmaterialien

2. Kulturmedien und Kulturbedingungen

2.1 Medien

2.1.1 Luria-Bertani-Medium (LB-Medium; Miller, 1972)

Pepton	10 g
Hefe-Extrakt	5 g
NaCl	10 g
H ₂ O _{bidest}	1000 ml

Zur Herstellung von festen Nährmedien wurde zusätzlich 1,5% (w/v) Agar zugesetzt.

Je nach Bedarf wurden dem Medium nach der Sterilisation und dem Abkühlen auf 55°C Antibiotika in den folgenden Konzentrationen zugegeben:

Ampicillin	50 µg/ml
Chloramphenicol	34 µg/ml

2.1.2 Modifiziertes ½ SME-Medium für *P. furiosus* und *P. woesei* (Stetter et al., 1983)

Substanz	1l
NaCl	27.7 g
MgSO ₄ x 7 H ₂ O	7 g
MgCl ₂ x 6 H ₂ O	5.5 g
CaCl ₂ x 2 H ₂ O	1.5 g
KCl	0.65 g
NaBr	0.1 g
H ₃ BO ₃	0.03 g
SrCl ₂ x 6 H ₂ O	0.015 g
0.1% Hefe-Extrakt	1 g
0.1% Pepton	1 g
0.2% KJ	25 µl
0.1% Resazurin	0.5 ml
Na ₂ S x 7 - 9 H ₂ O	0.5 g
H ₂ O _{bidest} ad	1000 ml

Für *P. furiosus* konnte dem Medium alternativ 0,1% (w/v) Stärke, 0,1% (w/v) Maltose und/oder 0,0046% (w/v) Trehalose zugefügt werden. *P. woesei* benötigte obligat 0,1% (w/v) Schwefel und 0,5% (w/v) Pepton im Medium.

2.2 Herstellung

2.2.1 Aerobe Medien

LB-Medium wurde zu je 10 ml in Reagenzgläser abgefüllt und diese mit Alukappen versehen. Für größere Anzuchten wurden Erlenmeyerkolben verwendet, die maximal zu 20% befüllt, mit Zellstoffstopfen verschlossen und sterilisiert wurden.

2.2.2 Anaerobe Medien

Das Kulturmedium (½ SME für *Pyrococcus furiosus*) wurde in eine 1 l Duranglasflasche (Schott AG, Mainz) abgefüllt, und diese mit einem Gummistopfen und einer durchbohrten

Schraubkappe (Schott GL 45, Schott AG, Mainz) verschlossen. Anschließend wurde das Medium für 30 min unter Druckausgleich mit N₂/CO₂ (80:20, v/v) durchgast. Der restliche Sauerstoff im Medium wurde durch Zugabe von 0,5 g/l Na₂S × 7 - 9 H₂O gebunden. Als Redoxindikator wurden 2 mg/l Resazurin zugesetzt. Der pH-Wert wurde bei Bedarf mit 1 M NaOH eingestellt, und das Medium in einer Anaerobenkammer zu je 20 ml in 120 ml Serumflaschen (Natronkalk-Silikat-Glas, Stute GmbH, Rheinbreitbach) oder zu 500 ml in 1 l Druckflaschen abgefüllt. Diese wurden mit Gummistopfen verschlossen und mit Aluminiumkappen gesichert. Abschließend wurden die Serumflaschen an der Gasstation je dreimal evakuiert und 300 kPa N₂/CO₂ (80:20, v/v) aufgepresst. Die Druckflaschen wurden mit 150 kPa N₂/CO₂ (80:20, v/v) begast. Die Sterilisation erfolgte wie unter II.4 angegeben.

2.2.3 Anaerobe Gelriteplatten

Die Herstellung des Mediums für anaerobe Platten folgte der Beschreibung unter II.2.2.2, wobei dem Medium zusätzlich 3% (w/v) Gelrite zugesetzt wurde. Nach dem Sterilisieren wurde das Medium bereits bei 95 – 100°C dem Autoklaven entnommen und nach vorsichtigem Entgasen der Flasche in die Anaerobenkammer eingeführt. Dort wurde das Medium in vorbereitete Glaspetrischalen gegossen und nach Verfestigung bis zur weiteren Verwendung in einem Anaerobentopf (Oxoid GmbH, Wesel) in der Anaerobenkammer aufbewahrt.

3. Verwendete Organismen und deren Kultivierung

3.1 Stämme

Stamm	Kultursammlung	Vertrieb/ Literatur
<i>E. coli</i> BL21 (DE3) pLysS	BB LRW	Novagen, Madison (USA)
<i>E. coli</i> BL21 Star (DE3)	BB LRW	Invitrogen GmbH (GIBCO), Karlsruhe
<i>E. coli</i> Rosetta (DE3) pLysS	BB LRW	Novagen, Madison (USA)
<i>E. coli</i> JM 109	BB LRW	New England Biolabs GmbH, Frankfurt
<i>Pyrococcus furiosus</i> VC1	BRB 19/12/3	DSMZ 3638; Fiala <i>et al.</i> (1986)
<i>Pyrococcus woesei</i> AN1	BRB 19/12/4	DSMZ 3773; Zillig <i>et al.</i> (1987)

Tabelle 11: Verwendete Stämme und Kulturen

BRB= Bakterienbank Regensburg; BB LRW= Bakterienbank Labor R. Wirth

3.2 Routinemäßige Kultivierung

Die Anzucht der hyperthermophilen Organismen *P. furiosus* und *P. woesei* erfolgte bei 90°C in Heißluftinkubatoren unter Schütteln bei ca. 50 Upm. Im Fall von *E. coli*-Stämmen wurden Anzuchten bis zu einem Kulturvolumen von 10 ml in Reagenzgläsern bei 37°C "gerollt". Größere Volumina wurden in maximal zu 20% gefüllten Erlenmeyerkolben in einem wassergefüllten Horizontalschüttler bei 37°C angezogen.

Anaerobe Platten wurden ausschließlich in der Anaerobenkammer ausgestrichen und in Anaerobentöpfen (Eigenbau der mechanischen Werkstatt der Universität Regensburg) mit 100 kPa N₂/CO₂-Gasphase (80:20, v/v) bei 85°C in Heißluftinkubatoren bebrütet.

3.3 Kultivierung im Großmaßstab

Zur Gewinnung größerer Zellmassen wurden die Kulturen anaerob in 300 l- bzw. 50 l-Fermentern (Bioengineering AG, Wald, Schweiz) gezüchtet. Die Medienbestandteile (½ SME-Medium) wurden eingewogen, im Fermenter in H₂O_{bidest} gelöst und 40 min bei 121°C autoklaviert. Anschließend wurde steriler Hefe-Extrakt (Endkonzentration 0,1% (w/v)) und steriles Pepton (Endkonzentration 0,1% (w/v)) zugegeben und das Medium mit sterilem Na₂S (0,5 g/l) reduziert. Der pH-Wert wurde mit steriler 5 M NaOH auf 6,5 – 7,0 eingestellt. Die Animpfdichte lag bei ca. 10⁵ Zellen/ml und die Fermentationstemperatur wurde stetig bei 90°C gehalten. Als Gasphase wurde N₂/CO₂ (80:20, v/v) mit einer Flussrate von 2 l/ min verwendet.

Zur Zellernte wurden die Zellen zunächst auf 4°C gekühlt (Durchlaufkühler, Feichtenschläger GmbH, Neusäß), anaerob in einen Edelstahltank (Gresser GmbH, Regensburg) überführt und mittels einer Durchlaufzentrifuge (Biofuge 28 RS) bei einer Durchlaufgeschwindigkeit von 70 ml/min und 5000 Upm geerntet. Die geernteten Zellmassen wurden in dem im Zentrifugenrotor verbliebenen Medienrestvolumen resuspendiert und sofort weiterverarbeitet (II.7.2).

4. Sterilisation

Medien, Puffer und Stammlösungen wurden unter feuchter Hitze in einem Autoklaven für 20 min bei 121°C und 200 kPa Druck sterilisiert. Wenn Schwefel in den Medien enthalten war, wurden diese für 1 h bei lediglich 110°C sterilisiert. Glasgeräte, Reaktionsgefäße und Pipettenspitzen, sowie mit Diethylpyrocarbonat behandelte Lösungen oder H₂O_{bidest}, das zur Herstellung von Stammlösungen für RNA-Arbeiten verwendet wurde, wurden unter den gleichen Bedingungen für 40 min autoklaviert. Des Weiteren wurden Glaswaren und Spatel für RNA-Arbeiten 3 h bei 200°C zur Sterilisation bei trockener Hitze gebacken. Glaspipetten wurden für 4 h bei 160°C unter trockener Hitze gebacken. Hitzeempfindliche Lösungen wurden mittels eines Cellulose-Acetat-Sterilfilters (Porengröße 0,22 µm) sterilisiert.

5. Mikroskopie

5.1 Phasenkontrast- und Fluoreszenzmikroskopie

5.1.1 Lichtmikroskopie

Zur standardmäßigen Mikroskopie wurde ein Nikon Labophot-2 Phasenkontrastmikroskop verwendet, das mit einem Ölimmersionsobjektiv (100x/1,25; Nikon) bzw. drei Luftobjektiven (4x/0,10; 10x/0,25; 40x/0,65; jeweils Nikon) ausgestattet war. Die Dokumentation erfolgte mittels einer Nikon Coolpix 950 Digitalkamera welche durch einen Adapter am Mikroskop befestigt werden konnte. Die Aufnahmen wurden mit Photoshop CS2 (Adobe Suite 2.3) digital nachbearbeitet.

5.1.2 (Hochtemperatur-) Phasenkontrast- und Fluoreszenzmikroskopie

Die Epifluoreszenzmikroskopie wurde an einem Olympus BX 50 Phasenkontrastmikroskop mit UV-Ausstattung durchgeführt.

Folgende Filtersätze (AHF Analystechnik AG, Tübingen) standen für die Epifluoreszenzmikroskopie zur Verfügung:

Farbstoff	Filter	Anregungsfilter	Teilerspiegel	Emissionsfilter
Alexa Fluor 532 oder 555	F41 – 003	HQ 546 ± 6	Q 560 LT	HQ 585 ± 20
AlexaFluor 488	F41 – 054	HQ 480 ± 20	Q 505 LT	HQ 520 ± 15
DAPI Fluorescence Brightener 28 (Calcofluor)	U – MNU2	360 - 370	DM 400	Sperr ± 420

Tabelle 12: Filtersätze des Hochtemperaturmikroskops

Zusätzlich verfügte das Mikroskop über ein extern steuerbares Heizgerät, das Mikroskoparbeiten bei Temperaturen von bis zu 95°C erlaubte. Das Mikroskop war hierfür in einem Plexiglasgehäuse (Eigenbau der mechanischen Werkstatt der Universität Regensburg) untergebracht. Über eine Steuereinheit konnten das Objektiv, der Objektisch und die Umluftheizung gesteuert werden. Detaillierte Beschreibungen zur Anwendung und Bedienung können den Arbeiten von C. Horn (1999) und M. Leisner (2004) entnommen werden.

Zur Dokumentation stand eine PixelFly CCD Kamera PCO.1600 mit der Steuerungssoftware CamWare v2.02 zur Verfügung. Es konnten sowohl Fotos als auch Kurzfilme erstellt werden. Die Aufnahmen wurden mit Photoshop CS2 (Adobe Suite 2.3) digital nachbearbeitet.

5.1.3 Mikroskopie in Kapillaren

Zur Mikroskopie unter erhöhten Temperaturen mussten die Zellkulturen in Laserkapillaren untersucht werden, welche anaerob befüllt und beidseitig verschlossen wurden. Dies verhinderte ein Eintrocknen der Proben bei Mikroskoparbeiten über längere Zeiträume

oder/und erhöhten Temperaturen. Detaillierte Beschreibungen zur Herstellung und Befüllung der Kapillaren können der Arbeit von S. Schopf (2006) entnommen werden.

5.1.4 Bestimmung von Zellzahlen

Die Bestimmung der Gesamtzellzahl, insbesondere zur Erstellung von Wachstumskurven, erfolgte mittels einer Thoma-Zählkammer (Kammervolumen: 0,02 mm x 0,0025 mm² pro Kleinstquadrat) und wurde nach folgender Formel ermittelt:

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

5.1.5 Fluoreszenzfärbungen

5.1.5.1 DAPI-Färbung

DAPI-Gebrauchslösung

3 M Natriumacetat pH 4,7	200 µl
0,5 M Na ₂ -EDTA	100 µl
10% (w/v) SDS	10 µl
DAPI (400 µg/ml)	200 µl
H ₂ O _{bidest}	ad 500 µl

Zu einem Tropfen zu betrachtender Kultur wurde je 1 µl der Gebrauchslösung auf einen Objektträger gegeben. Zellen, die auf festen Oberflächen aufgewachsen waren, wurden mit 2 – 3 µl DAPI-Gebrauchslösung versetzt. Die Lösung konnte bis zu einem Monat lichtgeschützt bei 4°C aufbewahrt werden.

5.1.5.2 Calcofluor-Färbung (Fluorescence Brightener 28)

Calcofluor-Gebrauchslösung

Calcofluor	0,05% (w/v)
------------	-------------

Verwendung und Lagerung erfolgten analog wie für die DAPI-Färbung angeführt (II.5.1.5.2).

5.1.5.3 (An)Aerobe Alexafluor-Färbung

Alexafluor-Farbstoffe als Succinimidylester binden kovalent an primäre Amingruppen (Lysine). Mittels dieser Färbung konnten die Zellen, aber auch deren Zellanhänge, im Fluoreszenzmikroskop analysiert werden.

Eine ausführliche Anleitung zur Portionierung des gelieferten Farbstoffes und der Durchführung des Färbeprotokolls kann der Arbeit von S. Schopf (2006) entnommen werden. Die Färbung konnte je nach Bedarf und der weiteren Verwendung der gefärbten Zellen entweder aerob oder anaerob im Anaerobenzelt durchgeführt werden.

5.2 Rasterelektronenmikroskopie

Fixanspuffer I

HEPES pH 7,0	100 mM
Glutardialdehyd	2,5% (v/v)

Zellen aus der Flüssigkultur wurden mittels Gefrierbruch präpariert. Hierzu wurde ein Tropfen der Zellkultur auf einen Objektträger gegeben, mit einem Deckglas abgedeckt und unverzüglich in flüssigem Stickstoff gefroren. Das Deckglas wurde mit einer Rasierklinge entfernt und die noch gefrorene Probe einer Fixierung mit 2,5% Glutardialdehyd in 75 mM Cacodylatpuffer (pH 7,0) und einer Postfixierung mit Osmiumtetroxid unterzogen. Anschließend wurde die Probe durch eine Acetonreihe entwässert und einer kritisch-Punkt-Trocknung mit CO₂ unterzogen.

Auf verschiedenen Materialien aufgewachsene Zellen, wurden bis zur weiteren Bearbeitung in Fixanspuffer I aufbewahrt. Wie bereits oben beschrieben wurden eine Postfixierung mit Osmiumtetroxid, eine Aceton-Entwässerungsreihe und abschließend eine kritisch-Punkt-Trocknung durchgeführt.

Die so präparierten Objektträger konnten auf dem Probenhalter montiert, mit 3 nm Platin (Magnetron sputter coater, model SCD 050; BAL-TEC, Walluf) beschichtet und anschließend mikroskopiert werden.

Alle rasterelektronenmikroskopischen Aufnahmen wurden von Prof. Gerhard Wanner am Botanischen Institut der LMU München mit einem Hitachi S-4100 Rasterelektronenmikroskop und dem Kamerasystem „Digiscan“ erstellt. Die Bildverarbeitung wurde unter Verwendung der Digital micrograph 3.4.4. Software (Gatan Digital Micrograph Inc., Pleasanton, CA) durchgeführt.

5.3 Transmissionselektronenmikroskopie

Die elektronenmikroskopischen Untersuchungen wurden an einem Philips CM12 Transmissionselektronenmikroskop (FEI Co., Eindhoven, NL) durchgeführt. Die Beschleunigungsspannung der durch eine LaB₆-Kathode erzeugten Elektronen betrug 120 kV. Zur Dokumentation wurde eine Slow-Scan-CCD-Kamera TEM 1000 (TVIPS-Tietz GmbH, Gauting) verwendet.

5.3.1 Herstellung und Kontrastierung von Suspensionspräparaten

Zellsuspensionen konnten wahlweise für 15 min mit Glutardialdehyd (Endkonzentration 2,5% (v/v)) fixiert werden, dies war für *P. furiosus* jedoch nur nötig, wenn die Proben nicht sofort weiter verarbeitet werden konnten. 20 ml der Zellsuspension wurden dann durch Zentrifugation (30 min, 5000 Upm; Labofuge GL) und Resuspendieren in einem kleinen Medienrestvolumen aufkonzentriert. Diese Suspension oder alternativ eine Proteinlösung

wurde auf befilmte und beglimmte Trägernetzchen der Wahl aufgetragen und dort für 1 - 10 min belassen. Die Flüssigkeit wurde vorsichtig von dem Trägernetzchen mit Hilfe eines Filterpapiers abgezogen und danach mit einem Tropfen essigsaurer, 2%iger (w/v) Uranylacetatlösung für 2 - 30 min kontrastiert. Je nach Dauer der Kontrastierung konnte so eine Negativ- oder Positivkontrastierung herbeigeführt werden. Wiederum wurde die Flüssigkeit vorsichtig auf einem Filterpapier abgezogen und das Trägernetzchen 2 - 5 x mit quartzdestilliertem H₂O gewaschen.

5.3.2 Gefrierätzung

Die zu verarbeitende Zellkultur wurde durch Zentrifugation (30 min, 5000 Upm; Labofuge GL) in einem sehr kleinen Volumen eingengt. 1,4 µl dieser aufkonzentrierten Zellsuspension wurden in einen Goldträger (BAL-TEC GmbH, Witten) überführt und sofort in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Auf eine chemische Fixierung konnte somit verzichtet werden. Die so gefrorene Probe wurde anschließend in eine auf -180°C vorgekühlte Hochvakuum-Bedampfungsanlage (CFE 50, Cressington Scientific Instruments Ltd., Watford, UK) überführt und auf -97°C erwärmt. Die Probe wurde mit einem -180°C kalten Messer gebrochen und das Oberflächenwasser im Hochvakuum für 10 - 15 min absublimiert. Zur Stabilisierung wurde das Präparat senkrecht mit Kohle (19 nm) und weiterhin im 25°-Winkel mit Pt/ Kohle (1 nm) bedampft. Das Metall-Kohle-Replika wurde anschließend auf H₂SO₄ (70% (v/v)) abflottiert und darauf über Nacht inkubiert. Das Replika wurde durch zweimaliges Umsetzen in quartzdestilliertes Wasser gewaschen und abschließend vorsichtig auf ein beglimmtes, jedoch unbefilmtes hexagonales Kupfernetzchen (G600) aufgebracht.

5.3.3 Tomographie

Zur Tomographie von Objekten und Strukturen mussten spezielle Kupfernetzchen (G100x400 mesh) verwendet werden. Diese wurden mit Kohlefolie belegt. Zur späteren Alignierung der Objekte wurden nach dem Beglimmen der Netzchen 40 µl (im Falle von darzustellenden Zellhüllen) oder 80 µl (im Falle von darzustellenden Flagellen) kolloidales Gold (10 nm; Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen) konsekutiv auf das Netzchen aufgetragen. Eine homogene Verteilung der Goldkörnchen wurde elektronenmikroskopisch kontrolliert und dann die gewünschte Probe aufgetragen und negativ/positiv kontrastiert (II.5.3.1). Mikroskopiert wurde mittels eines speziellen Hochkipphalters, dessen Kippwinkel zwischen +70° und -70° variiert werden konnte. Es wurden Serien mit jeweils 2° Winkelabstand aufgezeichnet, also jeweils 71 Bildern, die weiterhin verrechnet werden mussten.

5.3.4 Bildverarbeitung elektronenmikroskopischer Daten

Die digitale Verarbeitung von Tomographie-Aufnahmen fand mittels einer Alignierung der Einzelbilder aus den Aufzeichnungsserien und Verrechnung als 3D-Struktur (Rauschreduzierung und Fourier-Filterung) mit dem SEMPER image processing system (Saxton, 1996) statt. Alle weiteren elektronenmikroskopischen Aufnahmen wurden mittels Photoshop CS2 (Adobe Suite 2.3) bearbeitet, im Fall der REM-Aufnahmen wurden die primären Umrechnungsschritte durch Prof. Wanner an der LMU München durchgeführt.

6. Molekulargenetische Methoden

6.1 Isolierung von Nukleinsäuren

6.1.1 Puffer und Lösungen

TNE-Puffer

Tris/HCl pH 8,0	100 mM
NaCl pH 8,0	50 mM
Na ₂ -EDTA pH 8,0	50 mM

TE-Puffer

Tris/HCl pH 8,0	10 mM
Na ₂ -EDTA pH 8,0	1 mM

6.1.2 DNA-Isolierung

40 ml einer \bar{u} N-Kultur wurden nach dem Abkühlen auf RT für 15 min bei 5000 Upm zentrifugiert (Labofuge GL). Falls sich Schwefel im Medium befand, wurde die Kultur vorher über einen Faltenfilter abfiltriert. Das Pellet wurde in 800 μ l TNE resuspendiert, 100 μ l 10% (w/v) SDS und 100 μ l 10% (w/v) Sarkosyl zugegeben. Die Lösungen wurden durch vorsichtiges Invertieren gemischt. Nach Zugabe von 10 μ l RNase (10 mg/ml) wurde der Ansatz für 15 min bei RT gehalten und nach Zugabe von 50 μ l Proteinase K (20 mg/ml) für 1 h bei 55°C inkubiert. Es wurde 1 ml PCI (Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol) zugegeben, die Lösung für 30 min geschüttelt und danach für 15 min bei 10000 Upm und 4°C zentrifugiert (Centrifuge 5402). Dieser Schritt wurde so lange wiederholt, bis die jeweils danach abgenommene wässrige Phase vollkommen klar war. Anschließend wurde diese mit 1 ml Chloroform versetzt, gut gemischt und zentrifugiert (15 min, 10000 Upm, 4°C; Centrifuge 5402). Die abgenommene wässrige Phase wurde mit 800 μ l Isopropanol ausgeschüttelt und für 5 min bei höchster Geschwindigkeit zentrifugiert (Centrifuge 5402). Die DNA wurde schließlich mit 70%igem (v/v) Ethanol gefällt, das Pellet für 5 min luftgetrocknet und in der gewünschten Menge H₂O (GIBCO) gelöst.

6.1.3 Gesamt-RNA-Isolierung

Gesamt-RNA von *P. furiosus* wurde in drei verschiedenen Wachstumsstadien (früh exponentiell: ca. 1×10^7 Zellen/ml; spät exponentiell: 5×10^7 Zellen/ml; stationär: 1×10^8 Zellen/ml) isoliert. Hierzu wurden dementsprechend 40 – 200 ml Kultur für 15 min bei 5000 Upm (Labofuge GL) abzentrifugiert, das Pellet in 1 ml Trizol resuspendiert und für 10 min bei RT inkubiert. Danach wurden 0,2 ml Chloroform zugegeben und nochmals unter leichtem Schwenken für 3 min bei RT inkubiert. Es wurde für 15 min bei 12000 Upm und 4°C (Centrifuge 5402) zentrifugiert und dann die obere wässrige Phase abgenommen, welche mit 0,5 ml eiskalten Isopropanol gemischt und 10 min bei RT inkubiert wurde. Nach zehnmütiger Zentrifugation bei 12000 Upm und 4°C (Centrifuge 5402) wurde wiederum der Überstand abgenommen, mit 1 ml 70%igem (v/v) Ethanol versetzt und zentrifugiert (5 min, 7500 Upm, 4°C; Centrifuge 5402). Nach Entfernen des Überstandes wurde das Pellet für 15 min luftgetrocknet und schließlich in 100 µl H₂O_{DEPC} gelöst.

Zur Entfernung von DNA-Kontaminationen (die sich in späteren Versuchen störend auswirken würden) wurde die RNA mit 10 µl DNaseI und 70 µl RDD-Puffer versetzt (RNase-free DNase-Set) und für 15 min bei RT inkubiert.

Anschließend wurde eine Phenol-Chloroform-Fällung durchgeführt. Hierzu wurde die Lösung mit einem Volumenanteil Phenol versetzt und für 10 min bei 13000 Upm und 4°C (Centrifuge 5402) zentrifugiert. Die wässrige Phase wurde mit einem Volumenanteil PCI versetzt, zentrifugiert (s.o.) und die wässrige Phase wiederum mit einem Volumenanteil Chloroform ausgeschüttelt und zentrifugiert (s.o.). Abschließend wurde mit der abgenommenen wässrigen Phase eine Ethanol-fällung durchgeführt. Hierfür wurden 0,6 Volumenanteile eiskalter Isopropanol und 0,1 Volumenanteile 3 M Na-Acetat pH 7,5 zugegeben und zentrifugiert (s.o.). Das Pellet wurde in 1 ml 70%igem (v/v), eiskalten Ethanol gelöst und wiederum zentrifugiert (s.o.). Das gewonnene RNA-Pellet wurde für 15 min luftgetrocknet, in 50 µl H₂O (GIBCO) gelöst und bei –20°C aufbewahrt.

6.2 Quantifizierung von Nukleinsäuren

6.2.1 Photometrische Konzentrationsbestimmung

Die Konzentration und Reinheit von Nukleinsäure-Lösungen wurde durch die Messung der optischen Dichte bei den Wellenlängen 260 nm und 280 nm in einem Spektralphotometer Helios γ bestimmt. Aus der Absorption bei 260 nm konnte die Konzentration nach folgender Formel berechnet werden:

$$\text{Konzentration} = \text{OD}_{260} \times \text{Verdünnungsfaktor} \times \text{spezifische Konstante}$$

Aus dem Quotienten OD_{260}/OD_{280} konnte die Reinheit der Nukleinsäuren abgeschätzt werden.

Reine Nukleinsäure	Spez. Konzentration ($OD_{260}=1$)	OD_{260}/OD_{280}
genomische DNA	50 µg/ml	1,8
DNA-Oligonukleotide	20 µg/ml	1,8
Plasmid-DNA	20 µg/ml	1,8 – 2,0
RNA	40 µg/ml	1,8 – 2,0

Table 13: Konzentrationsbestimmung nach Maniatis et al., 1989

Verdünnungen wurden im Fall von DNA in sterilem H_2O_{bidest} , für RNA in H_2O_{DEPC} vorgenommen.

Die Proben konnten wahlweise auch am NanoDrop ND-100 Spectrophotometer vermessen werden.

6.2.2 Konzentrationsbestimmung mittels Ethidiumbromidplatten

Zur Abschätzung geringster DNA-Konzentrationen wurde auf eine Ethidiumbromidplatte (1% Agarose (w/v) in TE-Puffer (II.6.1), mit 5 µg/ml Ethidiumbromid) DNA-Mengenstandard bekannter Konzentration (6, 12, 25, 50, 100 µg/µl) aufgetropft. Parallel dazu wurde 1 µl der zu analysierenden DNA-Lösung aufgebracht und nach 10 min Einwirkzeit die Fluoreszenzstärken im UV-Licht ($\lambda = 254$ nm) miteinander verglichen und hieraus wiederum die DNA-Konzentration abgeschätzt.

6.3 Agarosegelelektrophorese

6.3.1 Puffer und Lösungen

TAE-Puffer

Tris/Acetat pH 8,3	40 mM
Na ₂ -EDTA pH 8,0	50 mM

MOPS-Puffer

MOPS	20 mM
Natriumacetat	5 mM
Na ₂ -EDTA	1 mM

DNA-Auftragspuffer (6x)

Tris/HCl pH 7,6	10 mM
Na ₂ -EDTA	60 mM
Xylencyanol	0,03% (w/v)
Bromphenolblau	0,03% (w/v)
Glycerin	60% (v/v)

RNA-Auftragspuffer (2x)

Formamid	95% (v/v)
SDS	0,025% (w/v)
Bromphenolblau	0,025% (w/v)
Xylencyanol	0,025% (w/v)
Ethidiumbromid	0,025% (w/v)
Na ₂ -EDTA	0,5 mM

6.3.2 Native Agarose-Gelelektrophorese

Die Analyse von PCR-Produkten, Plasmiden und genomischer DNA erfolgte auf 0,7 - 2,0%igen (w/v) Agarosegelen. Hierzu wurde die Agarose in TAE-Puffer durch Aufkochen gelöst, nach Abkühlen auf ca. 55°C mit Ethidiumbromidlösung (10 mg/ml) in 0,01%iger Endkonzentration versetzt und anschließend in eine horizontale Gelkammer (5 x 6 cm; 11 x 12 cm) gegossen.

6.3.3 Denaturierende Agarose-Gelelektrophorese

RNA wurde auf 1,2%igen (w/v) Agarose-Formaldehydgelen analysiert. Hierzu wurde 2,4 g peqGold Agarose (RNase-frei) in 200 ml 1x MOPS aufgekocht. Nach Abkühlung der Lösung auf 60°C wurden 3,6 ml 37%iges (v/v) Formaldehyd zugegeben und das Gel in eine horizontale Elektrophoreseapparatur (11 x 12 cm) gegossen. Die Elektrophorese erfolgte für 2,5 h unter einer Spannung von 40 V. Aufgetragen wurden jeweils 5 µg RNA, die vorher mit RNA-Auftragspuffer im Verhältnis 1:1 versetzt wurden. Als RNA-Marker wurden 5 µg RNA-Standard aufgetragen. Da der Auftragspuffer bereits Ethidiumbromid enthielt, musste dieses nicht dem Gel zugesetzt werden.

6.4 Reinigung von DNA aus Agarosegelen

Zur Reinigung von DNA-Fragmenten oder PCR-Produkten aus nativen Agarosegelen wurden die gewünschten Banden nach entsprechender elektrophoretischer Auftrennung unter UV-Licht ($\lambda = 254 \text{ nm}$) mit einem sterilen Skalpell ausgeschnitten. Die DNA wurde anschließend mit Hilfe des QIAEX II Gel Extraction Kits nach Angaben des Herstellers aus dem Agaroseblöckchen gereinigt. Die Konzentration wurde mittels Auftrag auf einer Ethidiumbromidplatte abgeschätzt (siehe II.6.2.2).

6.5 Autoradiographie

Die Detektion radioaktiv markierter RNA erfolgte mittels Autoradiographie. Es wurden Kodak BioMAX MS Filme (Eastman Kodak Co., Rochester, USA) in Kombination mit einem BioMAX MS Intensifying Screen (Eastman Kodak Co., Rochester, USA) verwendet. Die Exposition erfolgte bei -70°C für einige Stunden oder mehrere Tage. Alternativ konnten die markierten Membranen auf Storage Phosphor Imaging plates BAS-MS 2025 (Fujifilm

Europe GmbH, Düsseldorf) ausgelegt werden und die Signale mittels des Phosphorimagers Fla-5000 (Fujifilm Europe GmbH, Düsseldorf) und der dazugehörigen Software Image Reader Fla-5000 v2 (Fujifilm) ausgelesen werden. Eine Quantifizierung erfolgte mittels der Software Aida Image Analyzer v.3.28. Die angeregten Kristalle der gebrauchten Storage Phosphor Platten wurden mittels eines Erasers (Raytest GmbH, Straubenhardt) in den Ausgangszustand zurückgeführt.

6.6 Restriktionshydrolyse

Die Hydrolyse doppelsträngiger DNA mit Restriktionsendonukleasen erfolgte für ein bis drei Stunden bei 37°C in dem vom Hersteller mitgelieferten, bzw. bei Doppel- oder Mehrfachverdau, in dem vom Hersteller empfohlenen Puffer.

6.7 Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)

Alle PCR Reaktionen nach Saiki *et al.* (1985 und 1988) wurden in 0,2 ml Reaktionsgefäßen in einem Thermocycler als Hot-Start-PCR-Reaktionen durchgeführt. Für jeden Lauf wurden eine Nullkontrolle (ohne Zugabe von DNA) und eine Positivkontrolle (u.a. *E. coli*) mitgeführt. Je nach Anwendung und Größe des zu amplifizierenden Templates wurde zwischen verschiedenen Systemen und Programmen ausgewählt.

6.7.1 Routine-PCR/Ganzzell-PCR (Kolonie-PCR)

Routine-PCR-Anwendungen sowie PCR-Ansätze zur Identifikation positiver Transformanden nach Klonierungsexperimenten wurden mit dem Taq PCR Master Mix Kit durchgeführt. Bei einer Kolonie-PCR wurden anstatt isolierter DNA die Zellen direkt der PCR-Reaktionslösung zugesetzt. Der Hitzeschock einer Hotstart-PCR führte zum Lysieren der Zellen und der Freisetzung der DNA.

„Routine“-PCR: Taq PCR Master Mix Kit

PCR-Ansatz (20 µl):

2x Master Mix	10 µl
F-primer (25 ng/µl)	0,4 µl
R-primer (25 ng/µl)	0,4 µl
DNA (10 ng/µl)	0,5 µl
H ₂ O (QIAGEN)	8,7 µl

Programm:

Zyklenzahl	Zeit	Temperatur
1	3 min	94°C
35	1 min	94°C
	1 min	57°C
	5 min	72°C
1	10 min	72°C
1	∞	4°C

6.7.2 Reverse Transkriptions-PCR („RT-PCR“/cDNA-Synthese)

Durch die Verwendung der reversen Transkriptase konnte (m)RNA in cDNA umgeschrieben werden. Dies ermöglichte es unter anderem in späteren Versuchen (II.6.7.3) verschiedenste Transkripte mittels PCR nachzuweisen.

Alle „RT-PCR“-Arbeiten wurden nach Protokollangaben des Herstellers (Invitrogen GmbH, Karlsruhe) mit der Super Script II reversen Transkriptase in RNase-freier Umgebung durchgeführt. Bei jedem Lauf wurde eine Negativkontrolle (ohne RNA) mitgeführt.

PCR-Ansatz (20 µl):

RNA (1 µg)	1,5 µl	10 min 70°C 2 min auf Eis
random primer	1 µl	
H ₂ O _{DEPC}	9.5 µl	
5x First strand buffer	4 µl	10 min 25°C 2 min 42°C 2 min auf Eis
0,1 M DTT	2 µl	
dNTPs (je 2 mM)	1 µl	
Super Script II RT	1 µl	50 min 42°C 15 min 70°C

Je 3 µl der umgeschriebenen cDNA wurden elektrophoretisch aufgetrennt und dabei ebenso die Nullkontrolle kontrolliert. Die Lagerung erfolgte bei –20°C.

6.7.3 Nachweis spezifischer mRNA-Transkripte mittels PCR

Zur Analyse von mRNA-Transkripten wurde die mRNA wie unter II.6.7.2 beschrieben in cDNA umgeschrieben. Mittels der Kombination verschiedener Primer und unterschiedlicher PCR-Systeme konnten die gesuchten Transkripte nun aus dem cDNA-Pool heraus nach dem unten aufgeführten Schema amplifiziert werden.

Für jede durchgeführte PCR-Reaktion, in die cDNA eingesetzt wurde, wurde jeweils eine Positivkontrolle mit DNA unter Verwendung der gleichen Primerkombination angesetzt. Zudem wurde neben der üblichen Nullkontrolle ohne DNA eine weitere Nullkontrolle mit cDNA mitgeführt, die nach der „RT-PCR“ (II.6.7.2) zusätzlich mit RNase verdaut wurde.

Fragmente < 3 kb: Fast Start GC-rich PCR System

PCR-Ansatz (20 µl):

10x buffer	2 µl
MgCl ₂ (25 mM)	2 µl
dNTPs (je 2 mM)	2 µl
GC-rich solution (5 M)	4 µl
Polymerase (2 U/µl)	0,16 µl
F-primer (25 ng/µl)	0,4 µl
R-primer (25 ng/µl)	0,4 µl
(c)DNA (10 ng/µl)	0,5 µl
H ₂ O (GIBCO)	8,54 µl

Programm:

Zyklenzahl	Zeit	Temperatur
1	4 min	95°C
40	30 s	95°C
	30 s	57°C
	3 min	72°C
1	7 min	72°C
1	∞	4°C

Fragmente 3 kb bis 5 kb: Fast Start High Fidelity PCR System

PCR-Ansatz (20 µl):

10x buffer mit MgCl ₂ (18 mM)	2 µl
DMSO	2 µl
dNTPs (je 2 mM)	2 µl
Polymerase Enzyme Blend (5 U/µl)	0,2 µl
F-primer (25 ng/µl)	0,4 µl
R-primer (25 ng/µl)	0,4 µl
(c)DNA (10 ng/µl)	0,5 µl
H ₂ O (GIBCO)	12,5 µl

Programm:

Zyklenzahl	Zeit	Temperatur
1	2 min	94°C
10	30 s	94°C
	30 s	57°C
	5 min	68°C
25	30 s	94°C
	30 s	57°C
	7 min	68°C
1	7 min	68°C
1	∞	4°C

Fragmente > 5 kb: Expand Long Template PCR System

PCR-Ansatz (20 µl):

10x buffer 3 mit MgCl ₂ (2,75 mM)	2 µl
dNTPs (je 2 mM)	2 µl
Polymerase (5 U/µl)	0,3 µl
F-primer (25 ng/µl)	0,4 µl
R-primer (25 ng/µl)	0,4 µl
(c)DNA (10 ng/µl)	0,5 µl
H ₂ O (GIBCO)	14,4 µl

Programm:

Zyklenzahl	Zeit	Temperatur
1	2 min	94°C
10	10 s	94°C
	30 s	57°C
	8 min	68°C
10	10 s	94°C
	30 s	57°C
	8 min 30s	68°C
10	10 s	94°C
	30 s	57°C
	9 min	68°C
5	10 s	94°C
	30 s	57°C
	10 min	68°C
1	7 min	68°C
1	∞	4°C

Fragmente > 9 kb: Expand Long Range, dNTPack

PCR-Ansatz (20 µl):

5x buffer mit MgCl ₂ (12,5 mM)	4 µl
MgCl ₂ (25 mM)	1 µl
dNTPs (je 10 mM)	1,5 µl
DMSO	2,4 µl
Polymerase (5 U/µl)	0,28 µl
F-primer (25 ng/µl)	0,4 µl
R-primer (25 ng/µl)	0,4 µl
(c)DNA (10 ng/µl)	0,5 µl
H ₂ O (GIBCO)	9,52 µl

Programm:

Zyklenzahl	Zeit	Temperatur
1	2 min	92°C
10	10 s	92°C
	15 s	57°C
	12 min	68°C
25	10 s	92°C
	15 s	57°C
	8 min	68°C
1	7 min	68°C
1	∞	8°C

6.7.4 Aufreinigung von PCR-Produkten

Um nicht inkorporierte Primer, Nukleotide sowie Taq-Polymerase aus dem PCR-Ansatz wieder zu entfernen und die Probe gegebenenfalls aufzukonzentrieren, wurde der QIAquick PCR-Purification Kit nach Angaben des Herstellers verwendet.

6.7.5 Einführung von Restriktionsschnittstellen

Zur Konstruktion von Expressionsklonen mussten DNA-Fragmente in einem genau definierten Leseraster in die entsprechenden Expressionsvektoren eingebracht werden. Hierfür mussten am 5'-Ende und 3'-Ende des proteinkodierenden Gens zusätzliche

Restriktionsschnittstellen eingeführt werden. Es wurden Primer verwendet, welche die gewünschten Restriktionsstellen im entsprechenden Leseraster enthielten. Zur DNA-Synthese wurde die Pfu-Polymerase (Fast Start GC-rich System; siehe II.6.7.1.2) verwendet, da diese über einen Korrekturlesemechanismus verfügt. Zur Kontrolle erfolgte eine Sequenzierung (II.6.10), um möglicherweise erfolgte Basenaustausche bei der Genamplifikation auszuschließen.

6.7.6 Ligation von PCR-Produkten

Die Ligation gereinigter PCR-Produkte in den Vektor pQE30 (QIAGEN GmbH, Hilden) erfolgte mit einer Gradientenligation (4 - 37°C) über Nacht mittels T4 Ligase.

6.8 Klonierung und Plasmidpräparation

6.8.1 Herstellung kompetenter Zellen

Aus einer über Nacht-Kultur des gewünschten *E. coli*-Stammes wurden Kolben zu je 100 ml LB-Medium beimpft und bei 37°C bis zu einer OD von 0,6 inkubiert. Die Zellen wurden abzentrifugiert (10 min, 8000 Upm; Labofuge GL) und in 50% des ursprünglichen Volumens mit H₂O_{bidest} resuspendiert. Diese Schritte wurden wiederholt und die Pellets schrittweise in 25% und dann in 2% des vorangegangenen Volumens mit H₂O_{bidest} resuspendiert. Nach einer weiteren Zentrifugation (s.o.) wurde das Pellet schließlich 1:1 mit Glycerin (87%, v/v) versetzt und gelöst. Die Zellen wurden gebrauchsfertig aliquotiert und bei -70°C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

6.8.2 Elektroporation

Der Ligationsansatz (II.6.7.5) wurde zu 40 µl der gewünschten kompetenten *E. coli*-Zellen gegeben und diese 5 min auf Eis equilibriert. Der Ansatz wurde dann in eine Elektroporationsküvette (Biorad Laboratories GmbH, München) gefüllt und in der Elektroporationsapparatur GenePulser® II einer Spannung von 2000 V bzw. 800 Ω ausgesetzt. Die so behandelten Zellen wurden mit 200 µl LB-Medium aus der Küvette gespült und für 1 h bei 37°C inkubiert. Die Zellen wurden zu 10, 25, 50 und 175 µl auf LB-Platten mit den jeweiligen Antibiotikazusätzen ausplattiert und bei 37°C über Nacht inkubiert.

6.8.3 Plasmidpräparation

STET-Puffer

Tris/HCl pH 8.0	50 mM
Na ₂ -EDTA	50 mM
Saccharose	8% (w/v)
Triton X-100	0,1% (v/v)

Plasmidpräparationen konnten mit zwei verschiedenen Verfahren durchgeführt werden. Zur qualitativen Analyse, beispielsweise für Sequenzierungen, wurden die gewünschten Plasmide über den GeneJET™ Plasmid Miniprep Kit gereinigt. Zur Analyse im Fall von zu testenden Transformanden aus Klonierungsexperimenten wurden 1,5 ml üN-Kultur zunächst für 5 min bei 13000 Upm (Biofuge 13) abzentrifugiert. Dem Pellet wurden 300 µl STET-Puffer zugegeben, der Ansatz wurde zunächst für 5 min bei RT inkubiert und anschließend für 45 min bei 100°C gekocht. Nach Zentrifugation für 10 min bei 13000 Upm (Biofuge 13) konnte das Pellet mittels eines sterilen Zahnstochers entfernt und dem verbliebenen Überstand 8 µl 5%iges (w/v) CTAB und 300 µl 1,2 M NaCl zugesetzt werden. Die Plasmide wurden nun mit 750 µl EtOH_{absolut} präzipitiert und für 10 min bei 14000 Upm und 4°C (Centrifuge 5402, Eppendorf AG, Hamburg) abzentrifugiert. Die DNA wurde mit 1 ml 70%igem (v/v) Ethanol gewaschen, abzentrifugiert (s.o.) und das Pellet, nachdem es für 15 min luftgetrocknet wurde, in 20 µl H₂O (GIBCO) gelöst.

6.8.4 Hinterlegung von Klonen

Die gewünschten positiven Klone wurden als Glycerinkulturen hinterlegt. Hierzu wurde eine üN-Kultur angezogen, daraus 10 ml LB-Medium im Verhältnis 1:200 beimpft und die Kultur bei 37°C bis zu einer OD von 2 – 3 herangezogen. 3 ml dieser Kultur wurden für 10 min bei 14000 Upm (Biofuge 13) abzentrifugiert und in 0,5 ml sterilem LB-Medium aufgenommen. Zudem wurden 0,5 ml steriles Glycerin zugegeben und die Kulturen dann bei –20°C hinterlegt.

6.9 Sequenzierung von PCR-Produkten und Plasmid-DNA

Die Sequenzierungen von PCR-Produkten und Plasmid-DNA wurde von der Firma Geneart, Regensburg durchgeführt.

Sequenzieransatz:

Plasmid-DNA oder PCR-Produkt	150 – 300 ng
Primer (10 µg/µl)	1 µl
H ₂ O (GIBCO)	ad 8 µl

6.10 Sequenzdatenanalyse

Multiple Sequenzalignments wurden mit den Programmen BioEdit (Hall, 1999), ClustalW (Higgins *et al.*, 1994) und T-COFFEE (Notredame *et al.*, 2000) vorgenommen. Umrechnungen von Gensequenzen wurden mit den Programmen EMBOSS Revseq und EMBOSS Transeq (Rice *et al.*, 2000) durchgeführt.

6.11 Nachweis spezifischer Transkripte in der Gesamt-RNA von *Pyrococcus furiosus*

6.11.1 Herstellung ³²P-markierter dsDNA-Sonden

Zur Analyse des Operons wurden entscheidende Schlüsselfragmente per PCR mittels "Random Priming" markiert (Feinberg und Vogelstein, 1983 und 1984). Hierbei fand das Megaprime™ DNA Labelling System Verwendung, wobei mit dem Standardprotokoll nach Angaben des Herstellers gearbeitet wurde. Der Reaktionsansatz setzte sich folgendermaßen zusammen.

Ansatz:

DNA (5 ng/μl)	5 μl
Primerlösung	5 μl
dTTP	4 μl
dGTP	4 μl
dCTP	4 μl
[α- ³² P] dATP	5 μl
Reaktionspuffer	5 μl
Klenow-Fragment	2 μl
H ₂ O (GIBCO)	16 μl

Die DNA wurde vor Zugabe der dNTPs für 5 min bei 95 – 100 °C denaturiert. Der Gesamtansatz wurde für 10 min bei 37 °C inkubiert. Die Reaktion wurde schließlich durch Zugabe von 5 μl 0,2 M Na₂-EDTA gestoppt. Nicht eingebaute Nukleotide wurden mittels des Prinzips der Gelfiltration über Illustra Probe Quant G-50 Micro Columns (Radiolabeled Probe Purification Kit, GE Healthcare, München) nach Angaben des Herstellers entfernt.

6.11.2 Northern Blotting

6.11.2.1 Puffer und Lösungen

20 x SSC

Na ₃ -Citrat	0,3 M
NaCl	3 M

Denaturierungslösung

NaOH	0,5 N
------	-------

6.11.2.2 Durchführung

Nach elektrophoretischer Auftrennung der RNA (II.6.3.3) wurde das Gel für 30 min in der Denaturierungslösung geschwenkt, was den Transfer großer RNA-Moleküle erleichtern sollte. Nachdem das Gel mit H₂O_{DEPC} gespült wurde, folgte die Äquilibration für 20 min in 20 x SSC. Der Northern Blot wurde in die Turbo Blotter™ Apparatur nach Angaben des Herstellers geschichtet und genügend 20 x SSC in die Pufferrinne gefüllt, so dass der Transfer der RNA auf die Nylonmembran über Nacht gewährleistet wurde. Die Membran wurde kurz in H₂O_{DEPC} geschwenkt, um Salz- und Gelreste zu entfernen und anschließend eine halbe Stunde bei 80°C im Wärmeschrank gebacken, was zu einer irreversiblen

Fixierung der transferierten RNA auf der Membran führte. Die Membran konnte so bei Raumtemperatur bis zur weiteren Verarbeitung aufbewahrt werden.

6.11.3 Hybridisierung mit radioaktiv markierten dsDNA-Sonden

6.11.3.1 Puffer und Lösungen

Denaturierte DNA aus Heringssperma

DNA aus Heringssperma wurde in $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$ zu einer Konzentration von ca. 10 mg/ml gelöst und jeweils einmal mit Phenol und Phenol:Chloroform (1:1, v/v) ausgeschüttelt. Die wässrige Phase wurde 12x zügig durch eine Spritze mit einer gelben Kanüle gepresst. Die gescherte DNA wurde dann mit 2 Volumenanteilen eiskaltem Ethanol präzipitiert, abzentrifugiert und zu einer Konzentration von 10 mg/ml in $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$ gelöst. Die Lösung wurde für 10 min aufgekocht, aliquotiert und bei -20°C gelagert. Kurz vor Gebrauch wurde die DNA für 5 min in einem kochenden Wasserbad denaturiert, auf Eis kurz abgekühlt und zur Prähybridisierungs-/ Hybridisierungslösung zugegeben.

Denhardt`s (100x)

Ficoll 400	10 g
Polyvinylpyrrolidon	10 g
BSA	10 g
$\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$	ad 500 ml

Prähybridisierungslösung

Formamid	50% (v/v)
SSC (20x)	5x
Denhardt`s (100x)	5x
SDS	1% (w/v)
Denaturierte DNA aus Heringssperma (Zugabe erst unmittelbar vor Gebrauch)	100 $\mu\text{g}/\text{ml}$

Formamid

Formamid	200 ml
Serdolit	20 g

Die Lösung wurde 30 min bei RT gerührt, über einen Cellulose-Filter abfiltriert und in Aliquots bei -20°C gelagert.

Waschpuffer 1

SSC	0,2x
SDS	0,1 % (w/v)

Waschpuffer 2

SSC	2x
-----	----

6.11.3.2 Durchführung

Die Prähybridisierung der Nylonmembran wurde in 20 ml bereits auf 42°C vorgewärmter Prähybridisierungslösung in einem Hybridisierungsröhrchen (Whatman Biometra GmbH, Göttingen) für mindestens 4 h unter Rotation in einem Hybridisierungssofen durchgeführt. Zur Hybridisierung wurde die dsDNA-Sonde für 5 min bei 95°C denaturiert, kurz auf Eis abgekühlt und anschließend zur Prähybridisierungslösung zugegeben. Die Hybridisierung erfolgte üN. Die Membran wurde anschließend zunächst zweimal für 5 min bei RT, dann zweimal je 15 min bei 60°C in Waschpuffer 1 gewaschen. Abschließend wurde die Membran bei RT in Waschpuffer 2 geschwenkt und war bereit für die Detektion mittels Autoradiographie (II.6.6).

7. Proteinbiochemische Methoden

7.1 Zellaufschluss

Aufschlusspuffer

Lysozym (100 µg/µl)	25 µl
Dnase (30 µg/µl)	25 µl
Sarkosyl (20 mg/µl)	25 µl
SDS 1% (w/v)	10 µl
H ₂ O _{bidest}	ad 100 µl

Der Aufschlusspuffer wurde jeweils kurz vor Zugabe zur Zellsuspension frisch hergestellt.

TE-Puffer

Tris	10 mM
Na ₂ -EDTA	1 mM

SME-Waschlösung (aerob)

½ SME-Medium ohne Zugabe von Pepton bzw. Hefe-Extrakt und ohne Reduktion durch Na₂S.

Von einer früh stationären Kultur (Zellzahl von mindestens 8×10^7 Zellen/ml) wurden 100 ml durch Zentrifugation (15 min, 5000 Upm; Labofuge GL) geerntet. In einem weiteren Ansatz wurden 5 ml Zellen verwendet, deren Flagellen abgeschert wurden (II.7.2.2), wobei die Zellen durch Zentrifugieren für 15 min bei 8000 Upm (Biofuge 13) pelletiert wurden. Das Pellet wurde in 100 µl (nicht gescherte Zellen) bzw. in 20 µl (gescherte Zellen) TE-Puffer resuspendiert und dann im Verhältnis 1:1 mit Aufschlusspuffer versetzt.

Die Zellsuspension wurde dann abwechselnd für 30 min bei -20°C eingefroren und für 15 min auf 60°C erhitzt. Diese Prozedur wurde dreimal durchgeführt. Die aufgeschlossenen Zellen konnten dann elektrophoretisch (II.7.7.2) analysiert werden.

7.2 Flagellenpräparation

Für alle Präparationsschritte wurden Pipettenspitzen verwendet, deren Enden abgeschnitten wurden. Die entstehenden Scherkräfte die zum unerwünschten Abscheren der Flagellen führen könnten, sollten dadurch herabgesetzt werden.

7.2.1 Puffer und Lösungen

HEPES-Puffer (pH 7,0)

HEPES	0,1 M
-------	-------

HEPES-X-114-Puffer (pH 7,0)

HEPES	10 mM
NaCl	2% (w/v)
Triton X-114	1% (v/v)

HEPES-X-100-Puffer (pH 7,0)

HEPES	10 mM
NaCl	2% (w/v)
Triton X-100	0,5% (v/v)

HEPES-Waschpuffer (pH 7,0)

HEPES	10 mM
-------	-------

7.2.2 Präparation durch Abscheren (modifiziert nach Kalmokoff *et al.*, 1988)

Diese Methode stellte die gängige Form der Flagellenisolierung dar.

P. furiosus wurde in mindestens 50 l Großanzucht (II.3.3) bis zur gewünschten Zellzahl von mindestens 8×10^7 herangezogen. Die Zellen wurden wie unter II.3.3 beschrieben schonend geerntet. In einem nachfolgenden Zentrifugationsschritt wurden die Zellen für 30 min bei 8000 Upm (Sorvall® RC 5C Plus) pelletiert. Dieses Pellet wurde in maximal 50 ml HEPES-Puffer mit einer Glaspipette vorsichtig gelöst. Die Flagellen wurden durch eine anschließende Ultraturax-Behandlung (1 min, 13500 Upm; 10 s, 20500 Upm) von den Zellen abgesichert. Durch Zentrifugation für 30 min bei 17000 Upm (Sorvall® RC 5C Plus, SS34-Rotor) verblieben die Flagellen im Überstand und eine Pelletierung erfolgte anschließend mittels Zentrifugation (1h, 28000 Upm; Optima™ LE-80K Ultrazentrifuge, 60Ti-Rotor). Da sich in der Regel nicht nur Flagellen in dem Pellet befanden, wurde dieses über eine Dichtegradienten-Zentrifugation (II.7.4.1) weiter aufgetrennt. Die erhaltene Flagellenlösung wurde dialysiert (II.7.4.2) und konnte bis zur weiteren Verwendung bei 4°C gelagert werden.

7.2.3 Präparation durch Phasentransition mittels Triton X-114

(modifiziert nach Kalmokoff *et al.*, 1988)

Ein Liter einer früh stationären *P. furiosus* üN-Kultur, deren Zellzahl mindestens 8×10^7 Zellen/ml betragen sollte, wurde für 30 min bei 8000 Upm (Sorvall® RC 5C Plus; Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA; GSA-Rotor) zentrifugiert, in 2 ml des Zentrifugationsüberstandes resuspendiert, 28 ml H_2O_{bidest} und 500 µl DNase (2,5 mg/ml) zugegeben. Dann wurde für 30 min bei 17000 Upm (Sorvall® RC 5C Plus, SS34-Rotor) zentrifugiert, das Pellet in 10 ml eiskaltem HEPES-X-114-Puffer gelöst und für 60 min bei RT gerührt. Die Phasenseparation erfolgte durch eine dreißigminütige Inkubation bei 37°C und Zentrifugation für 5 min bei 300 Upm (Heraeus Labofuge GL). Die wässrige Phase konnte bei eindeutiger Trennung der Phasen abgenommen werden und wurde zunächst gegen HEPES-Dialyse-Puffer dialysiert (II.7.4.2), um eventuell verbliebene Triton-X-114-Reste zu entfernen. Die Probe musste mit der Vakuumzentrifuge DNAmi (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA) für die spätere Reinigung mittels Säulenchromatographie (II.7.4.3) zudem auf ca. 1,5 ml eingeeengt werden.

7.2.4 Präparation durch Zellyse mittels Triton X-100

(modifiziert nach Kalmokoff *et al.*, 1988)

Ein Liter einer früh stationären *P. furiosus* üN-Kultur (Zellzahl mindestens 8×10^7 Zellen/ml) wurde für 30 min bei 8000 Upm (Sorvall® RC 5C Plus, GSA-Rotor) zentrifugiert und das erhaltene Pellet in 200 ml HEPES-X-100-Puffer gelöst. Um die Viskosität der Lösung herabzusetzen, wurden zudem 100 µl DNase (2,5 mg/ml) und 100 µl 1M $MgCl_2$ zugegeben. Anschließend wurde für 1 h bei 28000 Upm (Optima™ LE-80K Ultrazentrifuge, 60Ti-Rotor) zentrifugiert, um die Flagellen zu ernten. Eine weitere Reinigung fand über Dichtegradienten-Zentrifugation (II.7.4.1) statt. Die Flagellenlösung wurde schließlich dialysiert (II.7.4.2) und konnte bei 4°C bis zur weiteren Verwendung gelagert werden.

7.3 Zellhüllenpräparation

Für eine Tomographie der Flagellen-Insertionsstelle in der Membran wurden die Zellhüllen von *Pyrococcus furiosus* schonend isoliert. Die Präparation lehnte sich sehr stark an die Flagellenpräparation durch Phasentransition mit Triton X-114 an. Ein Liter einer exponentiellen *P. furiosus* üN-Kultur (Zellzahl mindestens 8×10^7 Zellen/ml) wurde für 30 min bei 8000 Upm (Sorvall® RC 5C Plus, GSA-Rotor) zentrifugiert, das Pellet in 2 ml des Zentrifugationsüberstandes resuspendiert und 8 ml $H_2O_{entionisiert}$ und 500 µl DNase (2,5 mg/ml) zugegeben. Der Ansatz wurde üN bei 4°C inkubiert um eine möglichst gute Lyse der Zellen herbeizuführen und lichtmikroskopisch kontrolliert. Anschließend wurde zentrifugiert (30 min, 17000 Upm; Sorvall® RC 5C Plus, SS34-Rotor) und der Überstand vorsichtig

abgezogen. Das dunkle Pellet war von einer hellgrauen Schicht überlagert, die durch vorsichtiges Aufschwemmen mit 10 mM HEPES-Puffer (pH 7,0) von dem darunter liegenden, dunkleren Pelletanteil getrennt werden konnte. Eine lichtmikroskopische Kontrolle ergab, dass in dem dunklen Teil des Pellets intakte Zellen vorlagen, in dem helleren Teil Zellhüllen. Diese Zellhüllen konnten wie unter I.5.3 für die Tomographie präpariert werden.

7.4 Proteinreinigung

7.4.1 CsCl-Dichtegradienten-Zentrifugation

Abgescherte Flagellen (II.7.2) wurden anhand ihrer Dichte von anderen Zellbestandteilen aufgereinigt. Hierzu wurde die Proteinlösung mit CsCl (Endkonzentration 0,45 g/ml) versetzt und in durchsichtige Ultra Clear™-Röhrchen (Beckman Coulter GmbH, Krefeld) gefüllt. Anschließend wurde bis zur Gleichgewichtseinstellung zentrifugiert (48 h, 48000 Upm; Optima™ LE-80K Ultrazentrifuge, SW60-Rotor). Die entstandene(n) Flagellenfraktion(en) wurde(n) mittels einer Spritze mit blauer Kanüle durch seitliches Durchstechen des Röhrchens abgezogen. Zur Entfernung von CsCl aus den Fraktionen wurden diese einer Dialyse unterzogen.

7.4.2 Dialyse

7.4.2.1 Puffer und Lösungen

Lösung D1

NaHCO ₃	0,1 M
Na ₂ -EDTA	1 mM

Lösung D2 (pH 7,0)

NaCl	0,88 g/l
Na ₃ -Citrat	0,44 g/l

HEPES-Dialyse-Puffer (pH 7,0)

HEPES	5mM
-------	-----

7.4.2.2 Vorbereitung der Dialyseschläuche

Dialyseschläuche verschiedener Cut-off-Grenzen (=MWCO, molecular weight cut off) wurden in ca. 30 cm lange Stücke geschnitten und unter Rühren für 15 min in Lösung D1 gekocht. Die Schläuche wurden außen und innen mit H₂O_{bidest} gespült, in Lösung D2 autoklaviert und bei 4°C gelagert.

7.4.2.3 Durchführung

Die Dialyse gewährleistete einen Pufferaustausch oder die Entfernung störender Substanzen wie z.B. CsCl. Die zu dialysierende Proteinlösung wurde in entsprechende Dialyseschläuche mit gewünschter Cut-off-Grenze (MWCO 8000 – 10000) gefüllt, wobei die

beiden Enden mit je zwei Klemmen verschlossen wurden. Es wurde zunächst zweimal 2 h unter Rühren bei 4°C gegen 500 ml und abschließend üN gegen 1000 ml HEPES-Dialyse-Puffer dialysiert. Die Proteinlösung konnte danach dem Dialyseschlauch entnommen und weiter verarbeitet oder bei 4°C gelagert werden.

7.4.3 Säulenchromatographische Reinigung

HEPES-NaCl-Puffer (pH 7,0)

HEPES	10 mM
NaCl	150 mM

HEPES-Waschpuffer (pH 7,0)

HEPES	10 mM
-------	-------

Durch Phasentransition (II.7.2.3) gewonnene Flagellen konnten mittels Säulenchromatographie aufgereinigt werden. Die Sepharose 2B-Säule wurde an das Econo Chromatographie System angeschlossen. Zunächst musste die Säule mit 10 Säulenvolumen HEPES-NaCl-Puffer äquilibriert werden. Die Durchlaufgeschwindigkeit betrug zu jedem Zeitpunkt 0,5 ml/min. Die auf 1,5 ml aufkonzentrierte Flagellenlösung wurde für 1 min bei 14000 Upm (Biofuge 13) zentrifugiert, um ein Verstopfen der Säule durch größere Bestandteile der Lösung zu verhindern. Danach konnte die Lösung auf die Säule geladen werden und wiederum mit HEPES-NaCl-Puffer gewaschen werden. Sieben Minuten nach dem Probenauftrag wurde die Sammlung der Fraktionen à 0,5 ml gestartet, wobei die Proteinkonzentration der Fraktionen nach Wunsch photometrisch überwacht werden konnte. Die Flagellenfraktion befanden sich in der Regel innerhalb der Fraktionen 20 – 60. Die vereinigten Fraktionen konnten bis zur weiteren Verwendung bei 4°C gelagert werden. Die Säule wurde nach Gebrauch mit einem Säulenvolumen 0,5 M NaOH gewaschen, mit 5 Säulenvolumen HEPES-Waschpuffer äquilibriert und schließlich in HEPES-Waschpuffer mit 20% (v/v) Ethanol bei 4°C gelagert.

7.5 Heterologe Genexpression

Zur Expression von rekombinantem FlaB2 wurde das pET Vektor-System (Novagen, Madison, USA) verwendet. Transformiert wurde in die *E. coli* Stämme BL21 (DE3) pLysS und Rosetta (DE3) LysS. Der Rosetta™-Stamm trug ein Plasmid mit Genen, die für in *E. coli* seltene tRNA-Spezies (AGG, AGA, AUA, CUA, CCC und GGA) codieren, wodurch die Expression von rekombinantem Protein verbessert werden konnte. Zur Expression des Flagellins Fla B2 wurden die Vektoren pET 14b und pET 15b verwendet, wobei dem rekombinanten Protein N-terminal ein His-Tag, bestehend aus 6 konsekutiven Histidinresten, angefügt wurde. Zudem war eine Thrombin-Schnittstelle vorhanden. Durch

die hohe Affinität des His-Tags zu Ni^{2+} -NTA, wurde eine stringente Reinigung des Fusionsproteins, auch unter denaturierenden Bedingungen ermöglicht. Die Elution von gebundenem Protein von der Ni^{2+} -NTA-Säule erfolgte mittels kompetitiver Verdrängung durch 5 bis 1500 mM des Histidin-Analogons Imidazol.

Des Weiteren wurde zur Expression von 'FlaB0' und 'FlaB1' aus dem pQE-Vektorsystem (QIAGEN GmbH, Hilden) der low copy Expressionsvektor pQE30 verwendet, wobei die grundsätzlichen Bedingungen denen des pET-Systems entsprechen, außer dass keinerlei N-terminale Schnittstelle vorliegen. Für diesen Fall wurden die *E. coli*-Stämme BL21 (DE3) pLysS, BL21 Star (DE3) LysS und Rosetta (DE3) LysS für die Transformation verwendet.

Zur Expression der gewünschten Proteine wurden 500 ml LB-Medium mit 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Ampicillin und 34 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Chloramphenicol versetzt, mit 5 ml einer Transformanden-üN-Kultur beimpft und bei 37°C oder 30°C unter Schütteln bis zu einer OD_{600} von 0,4 – 0,5 angezogen. Dann wurde durch Zugabe von 1 mM IPTG (Endkonzentration) induziert und bis zur Genexpression für weitere 16 h bei 37°C schüttelnd inkubiert. Abschließend wurden die Zellen auf 4°C abgekühlt, für 30 min bei 5000 Upm abzentrifugiert (Sorvall® RC 5C Plus; Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA; GSA-Rotor) und bis zur Proteinisolierung bei -20°C gelagert. Die Zellen wurden zur weiteren Verarbeitung aufgeschlossen und nur das Pellet mit den Einschlusskörperchen (inclusion bodies) zur Gewinnung von rekombinanten Protein (s. II.7.6) weiter bearbeitet.

7.6 Reinigung rekombinanter Proteine aus *E. coli*

7.6.1 Puffer und Lösungen

LEW-Puffer (Lyse-Equilibrierungs-Waschpuffer; pH 8,0)

NaH_2PO_4	50 mM
NaCl	300 mM

DS-Puffer (Denaturierender Solubilisierungspuffer; pH 8,0)

NaH_2PO_4	50 mM
NaCl	300 mM
Harnstoff	6 M

DW-Puffer (Denaturierender Waschpuffer; pH 8,0)

NaH_2PO_4	50 mM
NaCl	300 mM
Harnstoff	6 M
Imidazol	10 mM

7.6.2 Durchführung

Rekombinante Proteine wurden unter denaturierenden Bedingungen durch Zugabe von 8 M Harnstoff gereinigt. Hierzu wurden 500 ml *E. coli*-Kultur zentrifugiert (30 min, 8000 Upm; Sorvall® RC 5C Plus, GS 3-Rotor) und das gewonnene Zellpellet in 5 ml LEW-Puffer

resuspendiert und 125 µl PMSF (7 ng/µl in Isopropanol) und 100 µl Lysozym (50 mg/ml) zugegeben. Der Ansatz wurde 30 min auf Eis gerührt und einer zweiminütigen Ultraschallbehandlung (dünne Spitze; Stufe 2; output 0,2) unterzogen. Anschließend wurde für 30 min bei 11500 Upm und 4°C (Sorvall® RC 5C Plus, SS-34-Rotor) zentrifugiert und die im Pellet verbliebenen Einschlusskörperchen (Inclusion Bodies) durch Zugabe von 5 ml LEW-Puffer und 125 µl PMSF solubilisiert. Nach einem weiteren Zentrifugationschritt (s.o.) wurde das Pellet in 1 ml DS-Puffer und 25 µl PMSF resuspendiert. Die Lösung wurde wiederum einer zweiminütigen Ultraschallbehandlung (s.o.) unterzogen und nochmals für 1 h auf Eis gerührt. Unlösliches Material wurde durch Zentrifugation für 30 min bei 11500 Upm bei 20°C (s.o.) pelletiert und der Überstand mit den gelösten rekombinanten Proteinen abgenommen.

Die bereits mit 4 ml DW-Puffer gewaschene Protino® Ni-TED Säule wurde mit dem Überstand beladen und die gebundenen rekombinanten Proteine durch anschließende Zugabe von DW-Puffer eluiert. Abschließend wurde die Säule mit zweimal 4 ml DS-Puffer gewaschen. Die Eluatfraktion konnten bei 4°C aufbewahrt werden und elektrophoretisch analysiert werden.

7.7 Analyse von Proteinlösungen

7.7.1 Proteinmengenbestimmung

Die Proteinkonzentration konnte am Spektralphotometer Heλios γ nach folgender Gleichung bestimmt werden (Ehresmann *et al.*, 1973):

$$\text{Proteinkonzentration } (\mu\text{g/ml}) = (\text{OD}_{228,5} - \text{OD}_{234,5}) \times 317,5 \times \text{Verdünnungsfaktor}$$

Des Weiteren konnte die Konzentration auch unter Verwendung des NanoDrop ND-100 Spectrophotometer ermittelt werden.

7.7.2 SDS-PAGE (SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese)

Je nach Bedarf wurden die Proteine auf Polyacrylamidgele nach dem System nach Lämmli (1970) oder nach Schägger und von Jagow (1987) aufgetrennt. Hierbei war zu beachten, dass es sich um verschiedene Auftrags- und Laufpuffer-Systeme handelte. Die Herstellung der Gele erfolgte jedoch nach dem gleichen Schema.

7.7.2.1 SDS-Polyacrylamidgele

Trenngel (für 1 Gel)

Prozentigkeit	8%	10%	11,5%	12,5%	20%
H ₂ O _{bidest}	2,9 ml	2,5 ml	2,2 ml	2,0 ml	0,5 ml
Acrylamid 30%	1,6 ml	2,0 ml	2,3 ml	2,5 ml	4,0 ml
1,5 M Tris/HCl (pH 8,8)	1,5 ml	1,5 ml	1,5 ml	1,5 ml	1,5 ml
APS (10%, w/v)	30 µl	30 µl	30 µl	30 µl	30 µl
TEMED	5 µl	5 µl	5 µl	5 µl	5 µl

Sammelgel (für 1 Gel)

Prozentigkeit	4 %
H ₂ O _{bidest}	1,2 ml
Acrylamid 30	300 µl
0,5 M Tris/HCl (pH 6,8)	500 µl
APS (10%, w/v)	15 µl
TEMED	3 µl

7.7.2.2 SDS-PAGE nach Lämmli (1970)

Auftragspuffer

Glycerin	10 ml
SDS (10%, w/v)	20 ml
1M Tris/HCl (pH 7.5)	6 ml
Bromphenolblau (1%, w/v)	1 ml
β-Mercaptoethanol	10 ml
H ₂ O _{bidest}	ad 100 ml

Der Auftragspuffer konnte wahlweise als Stammlösung ohne β-Mercaptoethanol hergestellt und bei 4°C aufbewahrt werden oder als Gebrauchslösung in kleinen Aliquots bei – 20°C gelagert werden.

Laufpuffer (4x)

Tris	12 g
Glycin	57,6 g
H ₂ O _{bidest}	ad 1000 ml

7.7.2.3 SDS-PAGE nach Schagger und von Jagow (1987)

Auftragspuffer (2x)

Glycerin (87%)	1,2 ml
SDS (10%, w/v)	5 ml
1M Tris/HCl (pH 7,5)	0,5 ml
Bromphenolblau (1%, w/v)	0,1 ml
0,1 M Na ₂ -EDTA	1 ml
H ₂ O _{bidest}	ad 10 ml

Die Stammlösung wurde in Aliquots bei 4°C aufbewahrt und erst vor Gebrauch 0,1 M DTT im Verhältnis 1/20 zugegeben.

Laufpuffer: Kathodenpuffer

Tris/HCl pH 8,3	12,114 g
Tricin	17,92 g
SDS	1 g
H ₂ O _{bidest}	ad 1000 ml

Laufpuffer: Anodenpuffer

Tris/HCl pH 8,8	24,228 g
H ₂ O _{bidest}	ad 1000 ml

7.7.2.3 Coomassie-Färbung (modifiziert nach Neuhoff et al., 1988)

SDS-Polyacrylamidgele wurden routinemäßig einer Coomassie-Färbung unterzogen. Hierbei können minimal 200 – 400 ng Protein/ Bande detektiert werden.

Coomassie-Färbung (30 min)

Coomassie Brilliant Blue G250	0,25% (w/v)
Methanol	50% (v/v)
Eisessig	20% (v/v)

Entfärben (üN)

Methanol	30% (v/v)
Eisessig	10% (v/v)

7.7.2.4 Silberfärbung (Blum et al., 1987)

SDS-Polyacrylamidgele konnten alternativ direkt oder nach vollständiger Entfärbung von Coomassie-gefärbten Gelen mittels einer Silberfärbung ausgewertet werden. Der Vorteil lag hier in einer niedrigeren Detektionsgrenze von bis zu 5 ng Protein/ Bande.

Fixierung	Methanol	50% (v/v)	30 min
	Eisessig	10% (v/v)	
Waschen	Ethanol	10% (v/v)	10 min
Waschen	Ethanol	50% (v/v)	10 min
Blockierung	Na ₂ S ₂ O ₃	0,02% (w/v)	1 min
Waschen	H ₂ O _{bidest}		3 x 20 s
Färbung	AgNO ₃	0,1% (w/v)	20 min
	37% Formaldehyd	0,028% (v/v)	
Waschen	H ₂ O _{bidest}		2 x 20s
Entwicklung	Na ₂ CO ₃	6% (w/v)	Bis zur deutlichen Entwicklung von Proteinbanden
	37% Formaldehyd	0,012% (v/v)	
Stoppen	Eisessig	10% (v/v)	üN

7.7.2.5 Periodat-Schiff-Färbung (PAS-Färbung)

Protein-Glykosylierungen wurden durch eine nicht reversible Färbung der glykosidischen Reste mittels der PAS-Färbung nachgewiesen.

Fixierung	Ethanol Eisessig	40% (v/v) 5% (v/v)	30 min
Oxidation	Periodsäure Eisessig	0,7% (w/v) 5% (v/v)	2 h
Waschen	Na ₂ S ₂ O ₅ Eisessig	0,2% (w/v) 5% (v/v)	30 min
Färbung	Schiffs Reagenz		ün
Entfärbung	Na ₂ S ₂ O ₅ Eisessig	0,1% (w/v) 5% (v/v)	Bis zur Entfärbung des Hintergrunds

7.7.2.6 Trocknung von Gelen

Geltrocknungslösung

Ethanol	22% (v/v)
2-Propanol	1% (v/v)
Glycerin	2% (v/v)

SDS-Polyacrylamidgele konnten durch ein Trocknungsverfahren dauerhaft aufbewahrt werden. Hierzu musste das zu trocknende Gel und jeweils zwei Cellophanfolien für eine halbe Stunde in die Geltrocknungslösung eingelegt werden und dann in die Trocknungsrahmen geschichtet und mit Klammern fixiert werden. Die Trocknung erfolgte ün im Abzug.

7.8 Western Blot

7.8.1 Transfer der Proteine auf eine PVDF-Membran

Towbinpuffer

Tris	48 mM
Glycin	39 mM
Methanol p.a.	20% (v/v)

Der Transfer von Proteinen aus SDS-Polyacrylamidgelen auf eine PVDF-Membran erfolgte mittels eines elektrischen Feldes in einer Western-Blot-Apparatur nach Anleitung des Herstellers. Auf das SDS-Gel wurde zusätzlich ein Prestained-Proteinmarker aufgetragen, was die Überwachung des Transfers erleichterte. Vor dem Blot wurde die Membran für 1 – 2 min in Methanol p.a. äquilibriert. Anschließend wurden die Membran und die benötigten Stücke Whatman 3MM Filterpapiere für 30 min in Towbinpuffer, das Gel hingegen nur für 15 min darin äquilibriert. Danach wurden Gel, Membran und die Filterpapiere nach Angaben des Herstellers in die Apparatur geschichtet. Die Blot-Dauer betrug 1 h bei einer konstanten Spannung von 10 V. Der Erfolg des Transfers konnte anschließend durch Färbung mit Coomassie (II.7.8.2) oder Ponceau S (II.7.8.3) kontrolliert werden.

7.8.2. Coomassie-Färbung von Western Blots

Im Falle einer nachfolgenden Sequenzierung einzelner Proteine mittels Edman-Abbau (II.7.9) wurde die PVDF-Membran mit einer Coomassie-Lösung gefärbt und anschließend entfärbt.

Coomassie-Färbung (5 – 10 min)

Coomassie Brilliant Blue G250	0,1% (w/v)
Methanol	50% (v/v)
Eisessig	10% (v/v)

Entfärben (üN)

Methanol	50% (v/v)
Eisessig	10% (v/v)

7.8.3. Ponceau S-Färbung (modifiziert nach Zacharius *et al.*, 1969)

Zur schnellen Kontrolle eines erfolgreichen Transfers der Proteine auf eine PVDF-Membran wurde eine reversible Färbung mit Ponceau S durchgeführt.

Ponceau S Färbung

Ponceau S	2% (w/v)
TCA	30% (v/v)

Durch mehrminütiges Schwenken der Membran in H_2O_{bidest} wurde zunächst der Hintergrund entfärbt, die transferierten Proteinbanden traten rot hervor. Durch weiter andauerndes Schwenken in H_2O_{bidest} wurde die Membran schließlich vollständig entfärbt und konnte für andere Versuche verwendet werden.

7.9 Sequenzierung von Proteinen mittels Edman-Abbau

Die Sequenzierung gewünschter Proteinbanden wurde durch die AG PD Dr. Deutzmann (Lehrstuhl für Biochemie, Universität Regensburg) durchgeführt. Eine direkte, N-terminale Ansequenzierung, ausgehend von einer geblotteten Bande, war nicht immer erfolgreich. Aus diesem Grund musste das Protein nach einem vorgegebenen Protokoll (Deutzmann, pers. Mitteilung; modifiziert nach Stone *et al.*, 1989; Allen, 1989) aufgetrennt und tryptisch bzw. chymotryptisch verdaut werden. Die Proteine wurden zunächst in einem 10%igen Polyacrylamidgel aufgetrennt und das Gel anschließend mit Coomassie gefärbt (II.7.7.2.3). Die gewünschten Proteinbanden wurden exakt mit einem Skalpell ausgeschnitten, das Volumen der Stücke abgeschätzt und in Eppendorf-Reaktionsgefäßen² gesammelt. Anschließend wurden die Gelstücke aufeinanderfolgend mit den angegebenen Substanzen

² Für die Probenvorbereitung zum Edman-Abbau war es wichtig, ausschließlich Reaktionsgefäße der Firma Eppendorf zu verwenden. Diese waren unbedenklich in Hinsicht auf ein Herauslösen von Polypropylen während des Verdauens (persönl. Mitteilung von E. Hochmuth; AG Deutzmann). Polypropylen überlagert das durch die Massenspektrometrie erhaltene Peakmuster und erschwert oder verhindert dessen Auswertung.

(jeweils 2 ml, jeweils 30 min) unter Schütteln inkubiert: NH_4HCO_3 (50 mM), NH_4HCO_3 (50 mM) in Acetonitril (25%, v/v), Acetonitril (25%, v/v), Acetonitril (50%, v/v), Acetonitril (100%). Danach wurden die Gelstücke bei Raumtemperatur getrocknet und über Nacht bei 37°C mit Trypsin/ Chymotrypsin in 50 mM NH_4HCO_3 (1 µg Trypsin/ Chymotrypsin pro 100 µl Gel) inkubiert (Gesamtpuffermenge: 1,5 x Ursprungsvolumen der Gelstücke). Die Zugabe dieses Puffers erfolgte dabei in zwei gleich großen Portionen (15 min Abstand), wobei der erste Teil die Gesamtmenge an Trypsin/ Chymotrypsin enthielt. Die Extraktion der entstandenen Spaltprodukte erfolgte durch Zugabe von 500 µl TFA (5%, w/v) und Inkubation für 1 h. Dieser Vorgang wurde zweimal wiederholt, beim dritten Mal wurde jedoch TFA (5%, w/v) mit Acetonitril (1:1) eingesetzt. Die drei Überstände wurden vereint und lyophilisiert (Vakuumentrifuge DNAmi). In einer anschließenden HPLC wurden die Peptide aufgetrennt und die Ergebnisse durch Eduard Hochmuth vom Labor von PD Dr. Deutzmann ausgewertet.

8. Immunologische Methoden

8.1 Produktion von spezifischen (primären) Antikörpern

Spezifische, polyklonale Antikörper wurden durch die Firma Davids Biotechnologie GmbH (Regensburg) hergestellt. Für die Produktion Flagellen-spezifischer Antikörper wurde Aufreinigung der Flagellen mittels des gängigen Protokolls durchgeführt (II.7.2.1). Zur Immunisierung gegen Peptidfragmente der einzelnen Flagellenuntereinheiten wurden heterolog exprimierte Proteine herangezogen (II.7.5). 0,2 – 2 mg des gewünschten Proteins bzw. Proteingemisches wurden zur konsekutiven Immunisierung eines Kaninchens benötigt. Eine Portion wurde dem Kaninchen gespritzt, zwei weitere wurden mit 2% (v/v) DMSO versetzt und bis zum weiteren Gebrauch tiefgefroren. Die Antikörper wurden im Regelfall mittels Ausbluten des Kaninchens gewonnen. Das Serum wurde danach durch eine Affinitätschromatographie (Protein G-Säule, s. II.11.8.2) aufgereinigt.

Um den Erfolg der Immunisierung zu überprüfen, wurde zudem ein Präimmunserum für Kontrolltests zur Verfügung gestellt.

8.2 Antikörper-Affinitätsreinigung

Waschpuffer (pH 7,0 bei 25°C)

$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$	57,7 ml
$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$	42,3 ml

Elutionspuffer I

Glycin/HCl (pH 2,7)	0,1 M
---------------------	-------

Elutionspuffer II

Glycin/HCl (pH 2,0)	0,1 M
---------------------	-------

Die Reinigung des gelieferten Serums erfolgte über eine Protein G-Säule. Protein G weist je nach *Streptococcus*-Stamm ein Molekulargewicht von etwa 58 bis 65 kDa und besitzt am C-Terminus drei homologe Bindungsdomänen mit hoher Bindungsaffinität für die Fc-Region von Immunglobulinen des Isotyps IgG. Deshalb können die spezifischen IgGs sehr gut aus dem Gemisch des Serums aufgereinigt und v.a. von Serumalbumin entfernt werden.

Die Pumpgeschwindigkeit über die Säule betrug durchgehend 0,5 ml/min. Die Säule wurde zunächst mit 10 Säulenvolumen (SV) Waschpuffer äquilibriert. Das Serum wurde für 10 min bei 5000 Upm (Biofuge 13) zentrifugiert, um ein Verstopfen der Säule durch gröbere Bestandteile des Serums zu verhindern. Nach dem Aufpumpen des Serums wurde zunächst mit 9 SV Waschpuffer gewaschen, bevor die Immunglobuline zunächst mit 7 SV Elutionspuffer I und dann mit 1 SV Elutionspuffer II von der Säule abgelöst und in Fraktionen gesammelt wurden. Die Fraktionen mussten beim Sammeln sofort mit einer entsprechenden Menge 1M Tris/HCl (pH 7,5) neutralisiert werden (hier 300 µl Tris-Puffer auf 1,7 ml gesammelte Fraktion). Letztendlich wurde die Säule mit 8 SV Waschpuffer gewaschen und konnte dann bei 4°C gelagert werden. Nach elektrophoretischer Kontrolle konnten die entscheidenden Fraktionen, welche die gereinigten Antikörpern enthielten, vereinigt werden.

8.3 Puffer und LösungenTBST-T-Puffer

Tris/HCl pH 7.6	0,24% (w/v)
NaCl	0,8% (w/v)
Tween 20	0,1% (v/v)

TBST-T*-Puffer

Tris/HCl pH 7.6	0,24% (w/v)
NaCl	0,8% (w/v)
Tween 20	0,1% (v/v)
Magermilch	5% (w/v)

Aminoethylcarbazol-Detektionslösung

3-Amino-9-Ethylcarbazol (in 1 ml EtOH p.a. gelöst)	20 mg	Vereinigte Lösung über einen Faltenfilter filtrieren und nur Filtrat weiterverwenden
0,02 M K-Acetat pH 5,0	49 ml	
10% (v/v) Triton X-100	100 µl	Erst kurz vor Gebrauch zum Filtrat zugeben
H ₂ O ₂	10 µl	

Inkubationspuffer

BSAc in PBS	0,0005 M
-------------	----------

PBS (10x; pH 7,4)

NaCl	80 g
KCl	2 g
Na ₂ HPO ₄ x 2 H ₂ O	14,2 g
KH ₂ PO ₄	2,4 g
H ₂ O _{bidest}	ad 1000 ml

PBS-Glycin-Lösung

Glycin in PBS	0,05 M
---------------	--------

PBS-Blockierungslösung

BSA	0,25 g
CWFS-Gelatine	5 µl
PBS	ad 5 ml

8.4 Immuno-Blot

Die zu untersuchenden Proteine mussten zunächst mittels Western Blot (II.7.8.1) auf eine PVDF-Membran übertragen werden. Die gesamte Membran wurde dann über Nacht durch Schwenken in TBST-T*-Puffer blockiert. Der primäre Antikörper wurde in der gewünschten Verdünnung zum TBST-T*-Puffer gegeben und die Membran darin für mindestens 4 h bei 4°C geschwenkt. Danach wurde dreimal je 10 min mit TBST-T*-Puffer gewaschen und dann der sekundäre Antikörper (anti-rabbit IgG gekoppelt mit Peroxidase; Verdünnung 1:2000 in TBST-T*) zugegeben und die Membran darin 1 h geschwenkt. Abschließend wurde dreimal je 10 min mit TBST-T* und zweimal je 10 min mit TBST-T-Puffer gewaschen.

Zur Detektion der markierten Proteine wurde die Membran solange in Aminoethylcarbazol-Detektionslösung geschwenkt, bis rötliche Banden sichtbar wurden. Die Membran wurde dreimal mit H₂O_{bidest} gewaschen und konnte nach dem Trocknen lichtgeschützt aufbewahrt werden.

8.5 Immunmarkierung für die Fluoreszenzmikroskopie

8.5.1 Immunmarkierung an Aufwuchspräparaten

Aus ün-Kulturen wurde das entsprechende Zusatzmaterial in ein Reaktionsgefäß gegeben, dieses mit 2 ml einer 1:250-Verdünnung des anti-Fla Pfu-Antikörpers (in SME-Waschlösung, siehe II.7.1) befüllt und für 90 min unter sanften Schütteln bei 600 Upm (Thermomixer compact) inkubiert. Das bewachsene Material wurde mit einer Pinzette in ein neues Reaktionsgefäß mit 2 ml steriler SME-Waschlösung gegeben und für 5 min inkubiert. Es wurden jeweils zwei Negativkontrollen mitgeführt, wobei einmal kein Antikörper und einmal anti-Pol UE D Antikörper (gerichtet gegen die Untereinheit D der *P. furiosus* Polymerase) verwendet wurden. Eine Kontrolle der Proben fand mittels DAPI-Färbung am Fluoreszenzmikroskop (II.5.1.3) statt.

8.5.2 Immunmarkierung von Flagellen aus Flüssigkulturen

Hierzu wurden Zellen aus einer frischen Zellkultur verwendet, wobei 20 ml der Kultur für 30 min bei 5000 Upm (Heraeus Labofuge GL) abzentrifugiert wurden und vorsichtig, unter Verwendung einer Pipettenspitze deren Ende abgeschnitten wurde, in 80 µl PBS-Puffer gelöst wurden. Es wurden 20 µl des primären Antikörpers (siehe II.1.3) zugegeben und der Ansatz für 1 h bei 37°C im Thermoblock (Thermomixer compact) inkubiert. Die Zellen wurden für 5 min bei 10000 Upm (Biofuge 13) abzentrifugiert und zweimal je 5 min bei 10000 Upm (s.o.) mit je 100 µl PBS-Puffer gewaschen. Der sekundäre Antikörper (anti-rabbit IgG gekoppelt mit AF 488) wurde in einer Konzentration von 10 µg/µl (in 100 µl PBS) eingesetzt. Es wurde zweimal mit je 100 µl PBS-Puffer gewaschen (s.o.) und die Zellen in 50 µl PBS-Puffer aufgenommen. Die markierten Zellen konnten dann mittels Fluoreszenzmikroskopie untersucht werden.

8.6 Immunmarkierung für die Elektronenmikroskopie

8.6.1 Transmissionselektronenmikroskop

Verwendung fanden frische Zellkulturen, die auf Nickelnetzchen (G400) aufgetragen wurden. Es wurden auch Suspensionspräparate von isolierten Flagellen (Nickelnetzchen G400) verwendet oder Trägernetzchen aus Aufwuchsversuchen (Gold- oder Nickelnetzchen, je G400). Keines der Präparate durfte hierfür kontrastiert werden. Für den primären Antikörper wurden Verdünnungsstufen zwischen 1:1000 und 1:20000 gewählt. Die Netzchen wurden jeweils mit der Oberseite nach unten auf die jeweiligen Flüssigkeitstropfen (ca. 50 µl) gesetzt und vor Überführung auf das nächste Tröpfchen feucht (mit der Rückseite des Netzchens) auf einem Filterpapier abgezogen. Es wurde je Versuchsansatz eine Negativkontrolle mitgeführt (ohne primären Antikörper).

Lösung	Dauer
PBS-Glycin	15 min
PBS-Blockierungslösung	20 min
PBS	3 x 5 min
Primärer Antikörper verdünnt in PBS	1 - 2 h
Inkubationspuffer	6 x 5 min
anti-rabbit IgG gekoppelt mit 6 oder 10 nm Gold; 1:30 in PBS	1 h
Inkubationspuffer	6 x 5 min
PBS	3 x 5 min
H ₂ O _{bidest}	2 x 5 min
Kontrastieren mit 2%iger UAc-Lösung	15 min
H ₂ O _{bidest}	5 min

8.6.2 Rasterelektronenmikroskop

Zur Untersuchung des Anheftungsverhaltens von *P. furiosus* wurden ün-Kulturen in Flüssigmedium mit Sand der Originalisoliationsstelle angezogen (siehe auch II.9). Etwa fünf

Körnchen des Sandes wurden mit Hilfe eines kleinen Löffelspatels in ein Reaktionsgefäß überführt und 50 µl PBS zugegeben. Der primäre Antikörper (anti-Fla Pfu; anti-Pol UE D) wurde in einer Verdünnung von 1:250 eingesetzt. Außerdem wurden zwei Nullkontrollen (ohne Zugabe eines Antikörpers; Zugabe von anti-Pol UE D) mitgeführt. Die Ansätze wurden für 1,5 h bei 37°C unter leichtem Schütteln mit 600 Upm in einem Thermoblock (Thermomixer compact) inkubiert. Danach wurde der Überstand vorsichtig abgezogen und je zweimal mit 50 µl PBS gewaschen (Schütteln mit 1000 Upm; Thermomixer compact). Der sekundäre Antikörper (anti-rabbit IgG gekoppelt mit 6 nm Gold) wurde in einer Verdünnung von 1:30 (in PBS) zugegeben und für 1,5 h bei 37°C unter leichtem Schütteln (600 Upm) im Heizblock inkubiert. Abschließend wurden die Sandkörnchen nach Abziehen des Überstandes wiederum zweimal gewaschen (siehe oben) und in 50 µl Fixanspuffer fixiert (siehe II.5.2). Die weitere Verarbeitung und Analyse fand am Lehrstuhl für Botanik der LMU München durch Herrn Wanner und dessen Mitarbeiter statt.

9. Physikalisch-biochemische Untersuchungen

9.1 Aufwuchs- und Anheftungsversuche

P. furiosus wurden in Flüssigkultur verschiedene biotische und abiotische Oberflächen zur Anheftung angeboten. Die unter II.1.10 (Tabelle 9) angegebenen Materialien wurden auf eine Größe von maximal 1 cm Kantenlänge zugeschnitten, so dass sie noch durch den Hals einer Serumflasche passten. Die Materialien wurden dem Medium zugefügt und mit diesem sterilisiert und mit einer Vorkultur beimpft. Nach der Inkubation üN wurden die Materialien entnommen und ein möglicher Bewuchs konnte wahlweise mittels Rasterelektronenmikroskopie (II.8.6.2) oder durch DAPI-Färbung (II.5.1.5.1) am Fluoreszenzmikroskop (II.5.1.2) analysiert und dokumentiert werden.

9.2 Untersuchungen zur Flagellenausbildung in verschiedenen Medien

Medien (jeweils 500 ml) mit den unten genannten Zusätzen wurden jeweils zu 0,01% mit einer frischen *P. furiosus*-Kultur beimpft und üN inkubiert. Über die gesamte Inkubationsdauer wurden die Zellzahlen bestimmt. Die Zellen wurden für 15 min bei 8000 Upm (Sorvall® RC 5C Plus, SS34-Rotor) geerntet, in 1 ml SME-Waschlösung (s. II.7.1) resuspendiert und für die Elektronenmikroskopie präpariert (II.5.3.1).

Medium

Medium 1: Modifiziertes ½SME für *Pyrococcus furiosus*

Medium 2: Modifiziertes ½SME für *Pyrococcus furiosus*

+ 0,1% (w/v) Stärke

+ 0,0046% (w/v) Trehalose

Medium 3: Modifiziertes ½SME für *Pyrococcus furiosus*

+ 0,1% (w/v) Stärke

+ 0,0046% (w/v) Trehalose

+ 0,1% (w/v) Maltose

9.3 Untersuchungen zur Stabilität der Flagellen

9.3.1 Einfluss des pH-Wertes

Für die pH-Bereiche zwischen pH 2 und pH 10 wurden jeweils Puffer aus den Puffersubstanzen hergestellt, die in den entsprechenden pH-Bereichen Pufferkapazität besaßen. Falls für einen pH-Bereich keine entsprechende Puffersubstanz vorhanden war, wurde SME-Waschpuffer (s. II.7.1) verwendet und der pH-Wert entsprechend eingestellt. Die Inkubation in den jeweiligen Puffern wurde bei 20°C durchgeführt. Flagellenpräparationen wurden im Verhältnis 1:1 in den jeweiligen Puffern verdünnt und für 15 min der jeweiligen Temperatur ausgesetzt. In „nicht-puffernden“ Lösungen wurde die Flagellenpräparation 1:10 verdünnt und ebenfalls für 15 min bei den jeweiligen Temperaturen inkubiert. Anschließend wurden die Proben für die SDS-Gelelektrophorese (siehe II.7.7.2) und Elektronenmikroskopie vorbereitet (siehe II.5.3.1).

<i>pH</i>	<i>Puffersubstanz oder Lösung</i>	<i>pK_a</i>	<i>Pufferbereich</i>
2	SME-Waschlösung	nicht bekannt	nicht bekannt
3	SME-Waschlösung	nicht bekannt	nicht bekannt
4	SME-Waschlösung	nicht bekannt	nicht bekannt
5	SME-Waschlösung	nicht bekannt	nicht bekannt
5,5	MES	6,1	5,5 – 6,5
6	MES	6,1	5,5 – 6,5
6,5	BisTris	6,5	5,8 – 7,2
7	MOPS	7,2	6,5 – 7,9
7,5	HEPES	7,5	6,8 – 8,2
8	Tricin	8,1	7,4 – 8,8
8,5	Tricin	8,1	7,4 – 8,8
9	AMPSO	9,0	8,3 – 9,7
10	CAPS	10,4	9,7 – 11,1

Tabelle 14: Zusammenstellung der Puffersubstanzen

9.3.2 Einfluss von Salzen und Detergentien

Der Einfluss verschiedenster Detergentien, chaotroper oder denaturierender Substanzen oder auch Proteasen wurde getestet. Hierzu wurde die Flagellenlösung in den in Tabelle 13 aufgeführten Verhältnissen mit der jeweiligen Lösung gemischt und für 1 h bei RT inkubiert. Anschließend konnten die Proben für das Elektronenmikroskop präpariert werden und auch elektrophoretisch untersucht werden.

<i>Substanz/ Lösung</i>	<i>Mischungsverhältnis (Flagellenpräp.:Lösung)</i>
MeOH/Chloroform (1:1)	5:1
6 M Harnstoff	1:1
3 M Harnstoff	1:1
3 M Guanidin x HCl	1:1
5 M Guanidin x HCl	1:1
1% (v/v) Triton X-100	1:1
1% (w/v) CTAB	1:1
1% (v/v) Tween 20	1:1

1% (v/v) Tween 80	1:1
1% (w/v) Taurodeoxycholat	1:1
1 mM, 10 mM, 100 mM Na ₂ -EDTA	1:1
SME-Waschlösung mit 5 mM DTT	1:1
SME-Waschlösung mit 10% (v/v) β-EtSH	1:1

Tabelle 15: Zusammenstellung der verwendeten Substanzen

9.3.3 Einfluss der Temperatur

Der Einfluss verschiedener Temperaturen auf die Flagellenstruktur bzw. der Proteinkomplexe wurde getestet. Die Flagellenpräparation wurde hierzu 1:1 in SME-Waschlösung, SME-Waschlösung mit 0,005 M DTT oder SME-Waschlösung mit 10% β-EtSH verdünnt und anschließend für 15 min bei 20°C, 40°C, 60°C, 70°C, 80°C, 90°C, 100°C und 121°C inkubiert. Die Proben konnten dann elektronenmikroskopisch oder mittels Auftrag auf ein SDS-Polyacrylamidgel untersucht werden.

10. Proteinsequenzdatenanalyse und Primerdesign

Alle Analysen zur Strukturberechnung oder zur Vorhersage von Sekundärstrukturen von Proteinsequenzen oder Teilsequenzen wurde mit dem Programm PredictProtein (Rost *et al.*, 2004) und zusätzlich mit Programmen, die auf der Webseite <http://expasy.org/> aufgeführt werden, durchgeführt. Untersuchungen zu offenen Leserahmen wurden mit dem Programm BioEdit (Hall, 1999) angefertigt.

Primer wurden vergleichend mit den Programmen Primer 3 (Rozen *et al.*, 2000) und Invitrogen Oligo Perfect™ Designer (Webseite der Firma Invitrogen) berechnet.

III. Ergebnisse

A) Charakterisierung der Zellanhänge

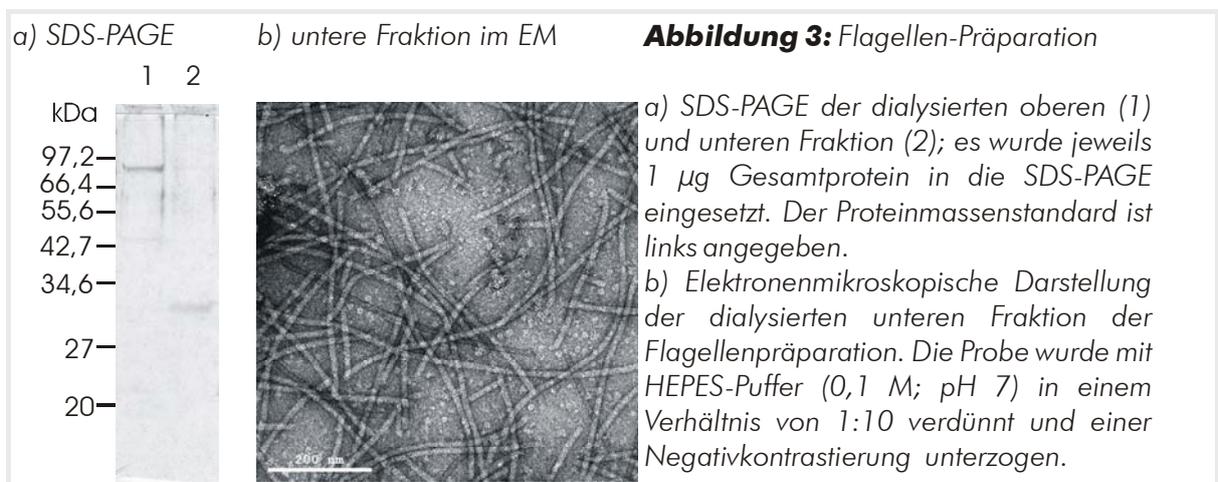
Gemäß der Erstbeschreibung (Fiala *et al.*, 1986) hat *Pyrococcus furiosus* zahlreiche Flagellen, die monopolar inseriert vorliegen. Zudem legt *P. furiosus* innerhalb seines Wachstumsoptimums ein ausgeprägtes Schwimmverhalten an den Tag. Um mehr über den Aufbau der Flagellen zu erfahren, mussten diese zunächst isoliert und charakterisiert werden. Physiologische, biochemische und mikroskopische Untersuchungen sollten Aufschluss über die Beteiligung der Flagellen an der Motilität oder darüber hinaus gehenden Funktionen geben.

1. Strategien zur Isolierung

Für eine möglichst große Ausbeute an Flagellen, mit möglichst geringer Verunreinigung durch andere Proteine, wurden die von Kalmokoff *et al.* (1988) beschriebenen Methoden getestet und für die Verwendung für *P. furiosus* modifiziert.

1.1 Abscheren der Flagellen

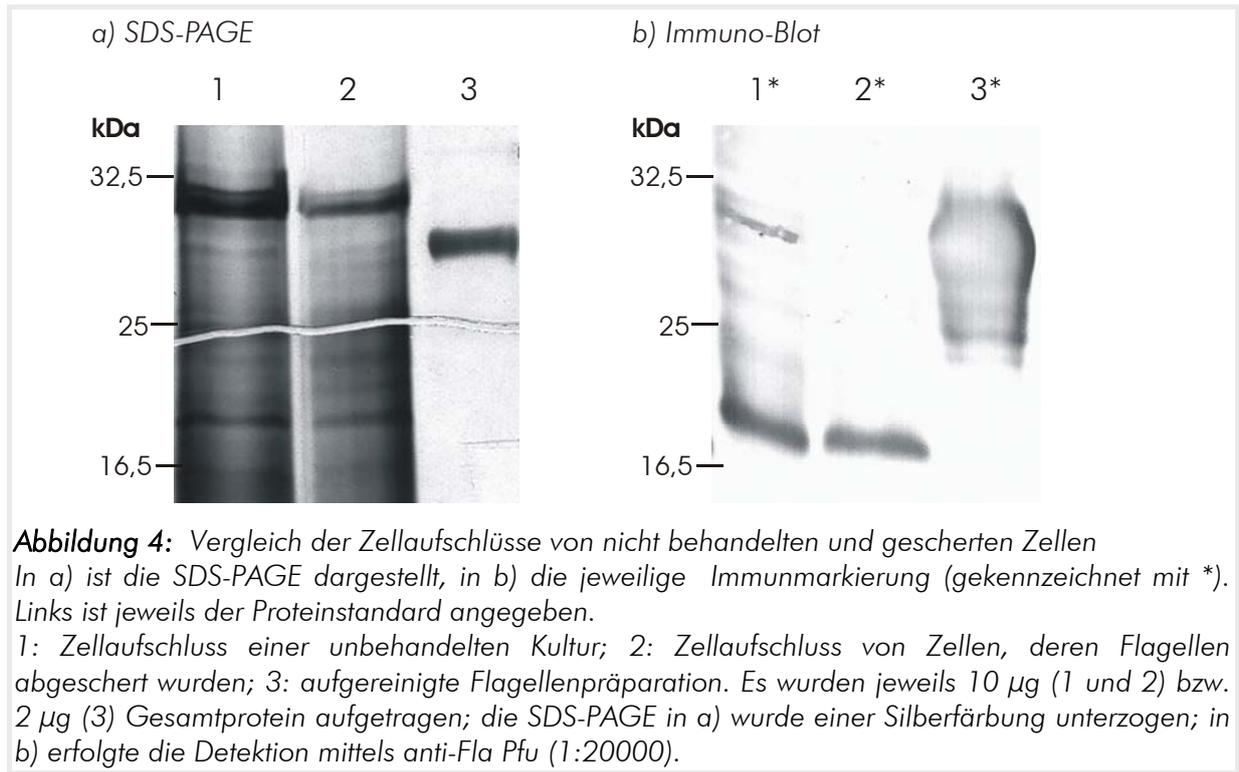
Mit dieser Methode wurden die Flagellen mittels eines Ultraturrax-Gerätes von den Zellen abgeschert. Dies stellte die Standardmethode zur Gewinnung von Flagellen dar, da eine ausreichende Menge an reinem Protein gewonnen werden konnte. Nach der isopyknischen Zentrifugation in einem CsCl-Gradienten konnten zwei Fraktionen, eine sogenannte „obere“ und eine „untere“ Fraktion isoliert werden. Die Benennung bezog sich dabei auf die Anordnung innerhalb des CsCl-Gradienten.



Im SDS-Polyacrylamidgel (Abb.3a) wird deutlich, dass in der *unteren* Fraktion die Hauptmenge des gesuchten Flagellenproteins mit einem Molekulargewicht von ca. 30 kDa isoliert werden konnte. Eine elektronenmikroskopische Analyse bestätigte dies (Abb.3b), da in der oberen Fraktion kaum Flagellen zu finden waren. Die so gewonnenen Flagellen(proteine) der unteren Fraktion wurden dialysiert und standardmäßig (wenn nicht anders angegeben) für elektronenmikroskopische, immunologische oder proteinbiochemische Analysen herangezogen.

SDS-PAGEs von frisch abgescherten Flagellen ergaben im Vergleich zu Abb.3a meist eine Vielzahl von Banden mit Molekulargewichten von 21 kDa, 30 kDa, 60 kDa und 90 kDa (SDS-PAGE nicht gezeigt). Nach mehrmaligen Einfrier- und Auftauvorgängen oder aber einer Lagerung bei 4°C konnten zumeist nur noch die in Abb.3 bzw. Abb.4 gezeigte Bande bei 30 kDa nachgewiesen werden.

Eine elektronenmikroskopische Kontrolle der gescherten Zellen zeigte, dass die Entfernung der Zellanhänge nicht vollständig durchführbar war. Ein Großteil der Zellen besitzt im Regelfall noch Flagellen, wenn auch nur sehr wenige im Vergleich zu den unbehandelten Zellen oder aber durch die mechanische Einwirkung sehr stark verkürzte, vermutlich abgebrochene Zellanhänge. Gescherte und nicht gescherte Zellen wurden aufgeschlossen und deren Proteine in einer SDS-PAGE aufgetrennt (Abb.4). Im Zellaufschluss der nicht gescherten Zellen ist nur eine sehr schwache Bande bei dem entsprechenden Molekulargewicht von 30 kDa zu erkennen. Deutlicher fiel der Nachweis mittels einer Immunmarkierung aus. In diesem Fall wurde ein Antikörper verwendet, der gegen die untere Fraktion der Flagellenpräparation (anti-Fla Pfu) gerichtet war. Vergleicht man nun die Zellaufschlüsse, so ist eine schmale Bande mit einem Molekulargewicht von 30 kDa in dem Zellaufschluss der unbehandelten Zellen, jedoch *keine* Bande in dem Zellaufschluss der gescherten Zellen nachzuweisen. Die Flagellen wurden also mehr oder weniger quantitativ abgeschert. Zusätzlich wurde durch die Antikörper ein Protein mit einem Molekulargewicht von 21 kDa markiert (s. auch III.4.1), das schon zuvor in frischen Flagellenisolierungen nachgewiesen werden konnte und deshalb wohl zu einer Immunreaktion des Kaninchens bei der Generierung der Antikörper geführt hatte.



Zellen, deren Flagellen abgeschert wurden, zeigten keine Beweglichkeit mehr. Um zu untersuchen, ob dies auf eine Schädigung der Zellen und *nicht* auf das bloße Abscheren der Flagellen zurückzuführen ist, wurde die Lebensfähigkeit der Zellen mit zweierlei Methoden getestet. Die behandelten Zellen wurden über mehrere Stunden bei 80°C mittels Thermomikroskopie (vgl. III.A.9.1) beobachtet. Es konnten keine schwimmfähigen Zellen beobachtet werden. Zudem wurden die Zellen mittels einer BacLight™-Färbung („Lebend-Tot-Färbung“, Invitrogen GmbH, Karlsruhe) kontrolliert. Weniger als 1% der Zellen zeigten laut der Färbung ein positives Membranpotential auf, konnten also demzufolge als lebend eingestuft werden. Da diese Auswertung aufgrund der geringen Menge an auszählenden "lebenden" Zellen im Vergleich zur Gesamtkultur zu unsicher erschien, wurden zudem parallele Wachstumsversuche angesetzt. In Verdünnungsreihen wuchsen unbehandelte Zellen bis zu einer Verdünnungsstufe von 10^{-8} an, gescherte Zellen wuchsen noch bis zu einer Verdünnungsstufe von 10^{-5} an. Letztendlich waren also ca. 1/1000 der Zellen als teilungsfähig einzustufen. Eine elektronenmikroskopische Kontrolle zeigte, dass diese, wieder angewachsenen Zellen eine vollkommen normale Morphologie mit normal ausgebildeten Flagellen aufwiesen. Eine Kontrolle im Thermomikroskop bewies zudem, dass diese Zellen auch normal schwimmfähig waren.

1.2 Solubilisierung mittels Triton X-100

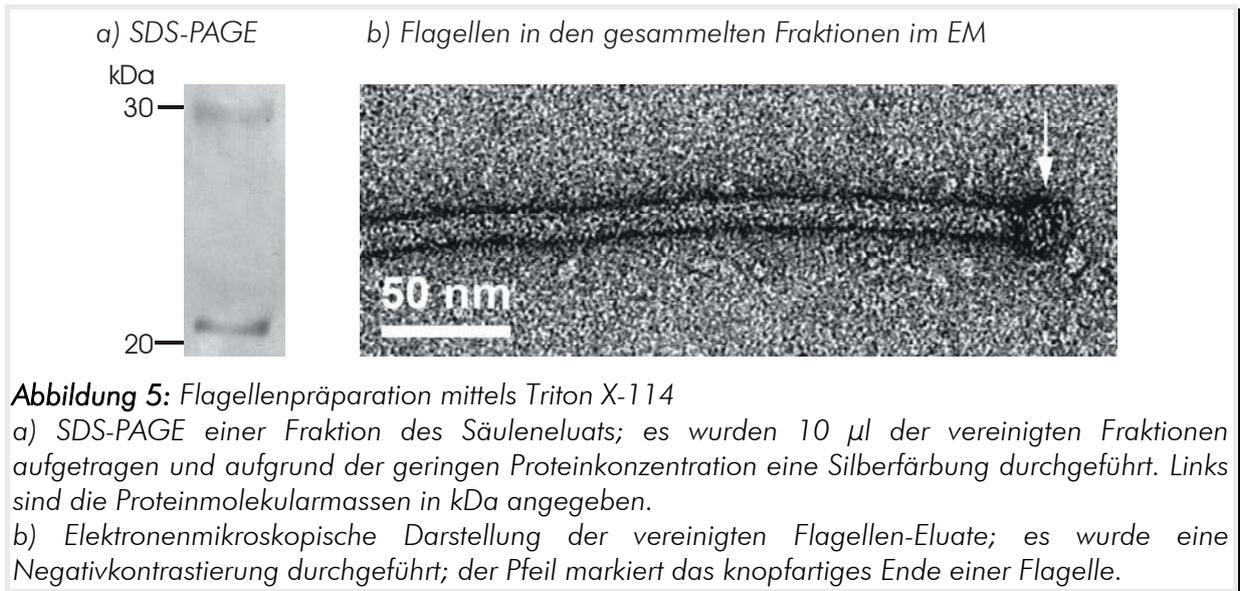
Die Gewinnung von Flagellen durch eine Solubilisierung der Zellen mittels Triton X-100 führte zu einer extrem hohen Menge an gewonnenen Flagellen aus einer vergleichsweise sehr geringen Menge an verwendeter Ausgangskultur. Im CsCl-Gradienten konnten zwei Fraktionen aufgetrennt werden, wobei sich die Flagellen im Gegensatz zu der unter III.A.1.1 beschriebenen Methode in einer höheren Anzahl in der *oberen* Fraktion befanden, als in der unteren Fraktion. Dies konnte sowohl elektronenmikroskopisch als auch durch eine SDS-PAGE gezeigt werden. In beiden Fraktionen waren jedoch noch viele weitere Proteine zu finden (SDS-PAGE nicht gezeigt). Die Flagellenproben konnten nicht rein von „Fremdprotein“ hergestellt werden, weshalb die Methode nicht als Standardmethode verwendet wurde.

1.3 Phasenseparierung mittels Triton X-114

Da bei den oben genannten Protokollen keine Verankerungsstruktur der Flagellen isoliert werden konnte, wurde die Membran mittels Triton X-114 solubilisiert, wobei mögliche Verankerungsstrukturen nach Angaben des verwendeten (modifizierten) Protokolls intakt bleiben sollten.

Nach der Behandlung mit Triton X-114 wurde die Phase, in der sich u.a. die Flagellen befanden, eingengt und einer Dialyse unterzogen, bevor eine Auftrennung der Proteine über eine Molekülsieb-Chromatographiesäule erfolgte. Die danach gesammelten Fraktionen wurden auf Proteingehalt getestet und die positiven Fraktionen vereinigt. Eine elektronenmikroskopische Kontrolle der säulenchromatographisch gereinigten Flagellen ergab, dass diese Methode vergleichsweise zu einer geringen Ausbeute an Gesamtprotein führte, die Proben jedoch sehr sauber vorlagen. Zudem konnte für ca. 5% der mikroskopierten Flagellen an jeweils einem Ende eine knopfartige Struktur nachgewiesen werden. Im SDS-

Polyacrylamidgel konnten zwei Proteinbanden mit Molekulargrößen von 30 kDa und 21 kDa nachgewiesen werden (Abb.5). Die Proteine dieser Banden wurden einer N-terminalen Sequenzierung unterzogen. Die Proteinbande mit 30 kDa konnte den Flagellenproteinen zugeordnet werden (vgl. III.A.1.1 und III.A.4.1), für die Bande mit einem Molekulargewicht von ca. 21 kDa konnte gezeigt werden, dass sie wohl nicht in Zusammenhang mit einer Verankerungs- oder Motorstruktur steht (vgl. III.A.4.1).



2. Wachstumsversuche

Nachdem eine ideale Isolierungsstrategie für die Flagellen etabliert wurde, sollte zudem getestet werden, ob sich eine Abhängigkeit der Flagellenanzahl von der Anzucht in bestimmten Medien zeigte. Die Verwendung verschiedener Zusätze könnte hierbei möglicherweise eine Rolle spielen. Bei den zusätzlich verwendeten Zusätzen (s.u.) wurde in früheren Versuchen ein schnelleres Wachstum von *P. furiosus* beobachtet, was wiederum in Zusammenhang mit der ausgebildeten Flagellenanzahl stehen könnte. Zur Isolierung der Flagellen wurde das unter III.A.1.1 aufgeführte Standardverfahren verwendet. Es wurden drei verschiedene Medien getestet. Das als Medium 1 bezeichnete entspricht dem in der Erstbeschreibung von Fiala *et al.* (1986) verwendete *Pyrococcus*-Medium unter Zusatz von 0,1% Hefeextrakt und 0,1% Pepton. Medium 2 enthielt zusätzlich dazu 0,1% (w/v) Stärke und 0,0046% (w/v) Trehalose und Medium 3 wurde zu den bisher genannten Zugaben zudem 0,1% (w/v) Maltose beigefügt. Das Wachstumsverhalten der in den drei unterschiedlichen Medien angezogenen Kulturen wurde lichtmikroskopisch kontrolliert und die Zellzahlen im Abstand von jeweils 2 Stunden bestimmt (Abb.6).

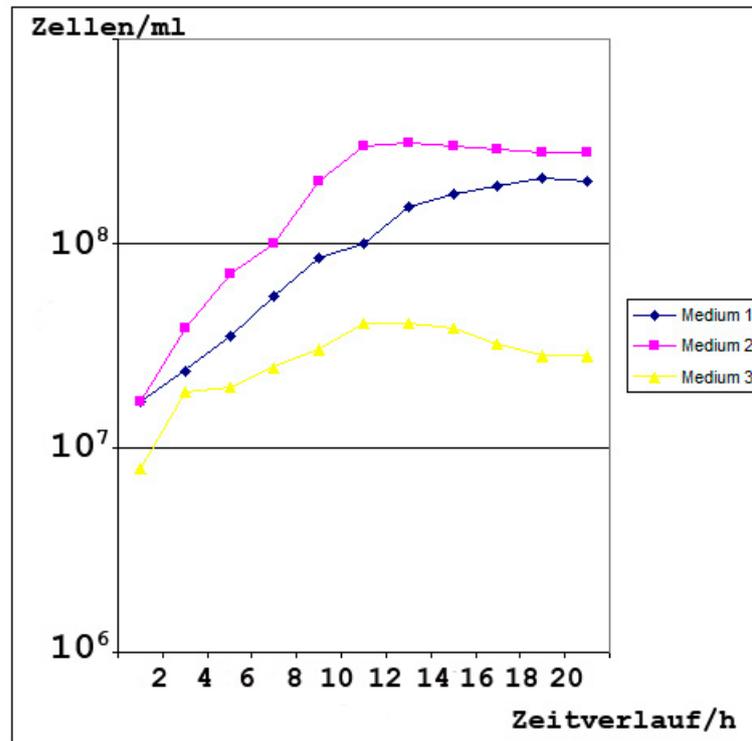
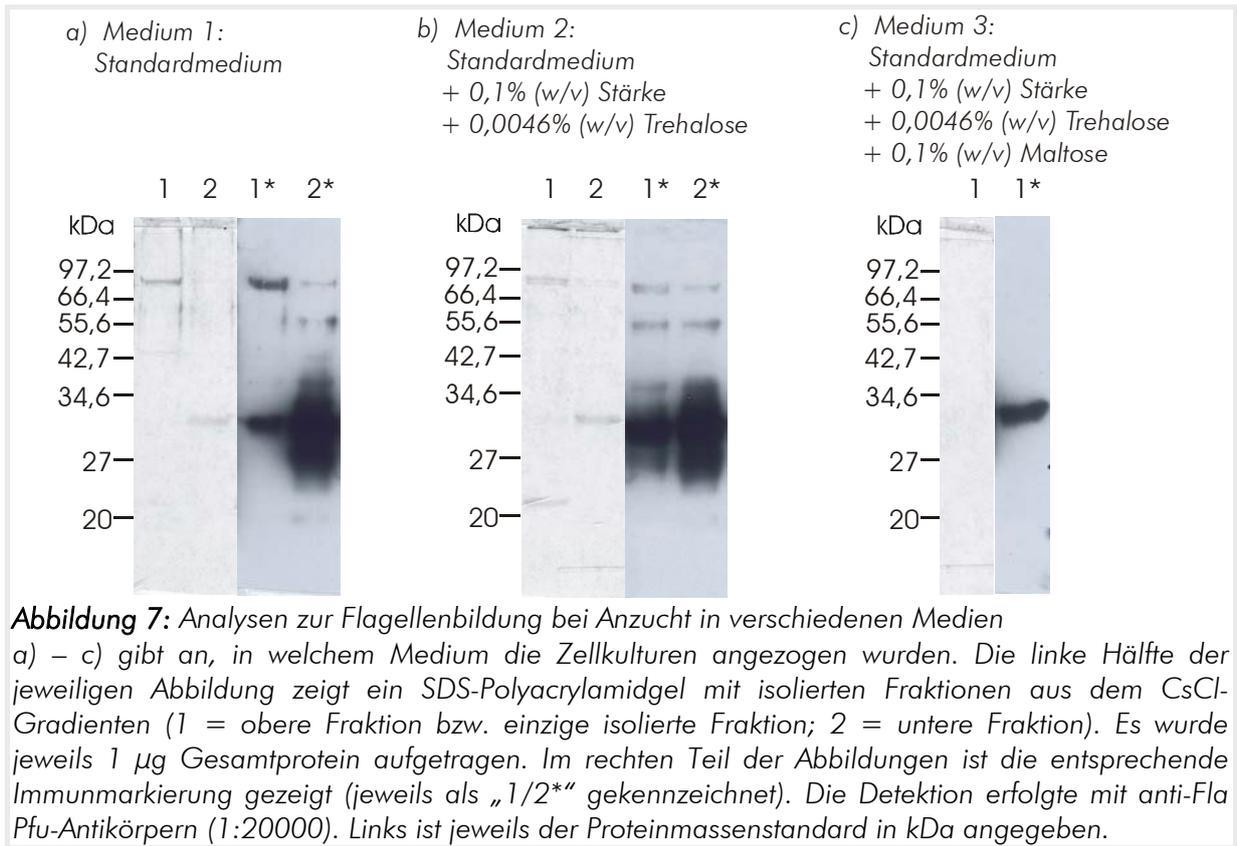


Abbildung 6: Wachstumskurven von *P. furiosus* angezogen in 3 verschiedenen Medien

Zellen die auf Medium 2 gewachsen waren, zeigten im Vergleich mit dem Ansatz im Standardmedium (Medium 1) das schnellste Wachstum und die höchsten Zellzahlen (bis zu 3×10^8 Zellen/ml). Wurde Medium 3 zur Anzucht verwendet, ging das Wachstum insgesamt sehr stark zurück. Das Wachstum setzte stark verzögert ein und die Kulturen wuchsen nur bis auf eine maximale Zellzahl von $3 - 4 \times 10^7$ Zellen/ml.

Von allen Ansätzen wurden jeweils die Flagellen aus einer Kultur isoliert, die sich in der früh stationären Phase befand. Bis auf den sehr niedrig angewachsenen Ansatz aus Medium 3, konnten zwei Fraktionen (obere/untere Fraktion) aus dem CsCl-Gradienten abgezogen und dialysiert werden. Alle gewonnenen Proben wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt. Zusätzlich wurden die Fraktionen mittels eines Immunoblots mit dem anti-Fla Pfu-Antikörper getestet (Abb.7).



Die SDS-Polyacrylamidgele der ersten zwei Medien-Ansätze (Abb.7a/b) ähneln sich stark. In den *unteren* Fraktionen (mit "2" bezeichnet), die vom CsCl-Gradienten abgezogen wurden, liegen jeweils die Flagellen vor. Durch die Immunmarkierung beider Fraktionen konnte auch in der jeweils oberen Fraktion eine, wenn auch schwächere, Bande mit dem Molekulargewicht der Flagellen von 30 kDa nachgewiesen werden. Zusätzlich wurden, insbesondere durch die Immunreaktion, Banden mit den Molekulargewichten von 21kDa, 60 kDa und 90 kDa nachgewiesen (siehe hierzu III.A.1.1 und III.A.4.1).

In der SDS-PAGE der Flagellen-Präparation aus Medium 3 konnte auf dem SDS-Polyacrylamidgel zunächst kein Protein nachgewiesen werden, durch die Immunmarkierung lies sich jedoch eine Bande mit einem Molekulargewicht von 30 kDa markieren (Abb.7c). Es lagen also Flagellen in sehr geringer Konzentration in dieser Präparation vor.

Eine elektronenmikroskopische Kontrolle der Zellen ergab keine Unterschiede zwischen dem Ansatz aus Medium 1 und dem aus Medium 2. In beiden Fällen konnten gut ausgebildete Flagellenbüschel dargestellt werden. Zudem waren häufig Verbindungen zwischen zwei Zellen zu erkennen. Der Präparationsansatz aus Medium 3 konnte aufgrund der starken granulären Strukturierung der Probe nur schlecht mikroskopiert werden. Wenn Zellen vorhanden waren, waren an diesen zumeist nur sehr wenige Flagellen zu sehen (Abb.8).

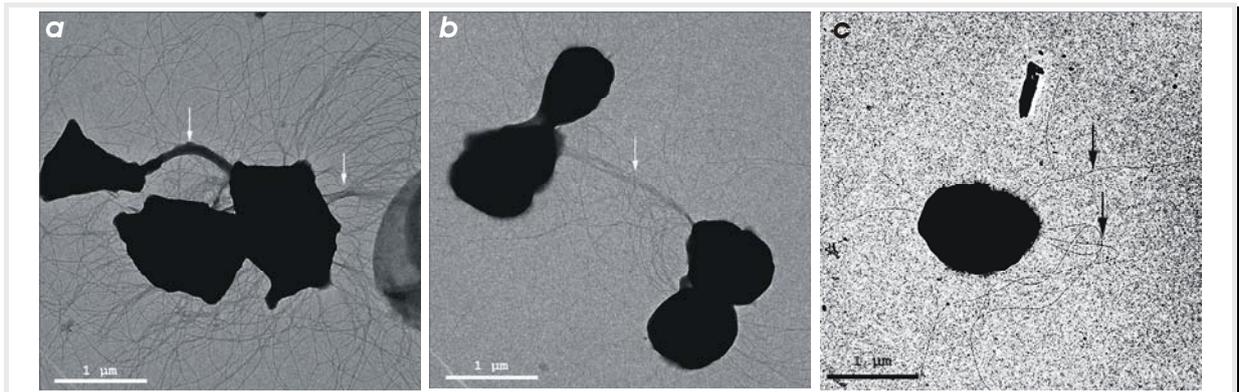


Abbildung 8: Elektronenmikroskopische Darstellung von Zellen aus den verschiedenen Medien

a) Medium 1: $4,9 \times 10^7$ Zellen/ml

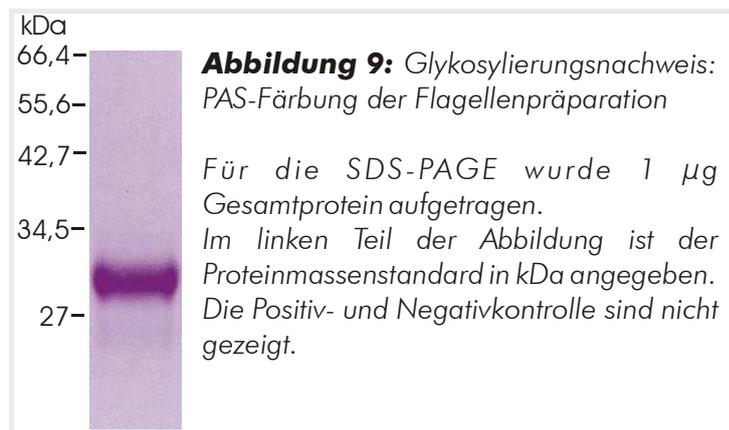
b) Medium 2: $9,7 \times 10^7$ Zellen/ml

c) Medium 3: $4,2 \times 10^7$ Zellen/ml

Die Zellen wurden einer Negativkontrastierung unterzogen; in den Abbildungen sind die Flagellen und/oder Zell-Zell-Verbindungen mit Pfeilen markiert. In c) wurde mittels Bildverarbeitung der Kontrast verstärkt, um die wenigen vorhandenen Flagellen sichtbar zu machen.

3. Nachweis der Glykosylierung

Archaeelle Flagellenproteine weisen im Gegensatz zu bakteriellen Geißeln typischerweise eine signifikante (N-)Glykosylierung auf (Jarrell *et al.*, 2001; Upreti *et al.*, 2003; Eichler, 2004; Voisin *et al.*, 2005). Eine Periodat-Schiff Färbung (PAS-Färbung) der mittels SDS-PAGE aufgetrennten Flagellenproteine ergab eine starke Glykosylierung des Flagellenproteins (Abb.9).



4. Sequenzanalysen

4.1 Proteinsequenzierungen

Da bei der Analyse der frischen Flagellenpräparation mehrere Banden im SDS-Polyacrylamidgel nachgewiesen werden konnten, musste zunächst überprüft werden, ob es

sich ausschließlich um Proteine zum Aufbau des Filaments handelte, oder ob weitere Proteine mit aufgereinigt wurden.

Eine mehrfach durchgeführte N-terminale Sequenzierung der Proteinbande mit einem Molekulargewicht von 30 kDa erbrachte die in Tabelle 13 aufgeführte **Sequenz 1**. Auch die Bande mit dem Molekulargewicht von 60 kDa führte nach mehrfach durchgeführten N-terminalen Sequenzierungen des Proteins zu **Sequenz 1**. Es handelt sich somit um ein Dimer des Flagellenproteins mit dem Molekulargewicht von 30 kDa.

Sequenz 1	AVGIGTLIVFIA
-----------	--------------

Das ermittelte Peptid der **Sequenz 1** wurde einer Blast-Analyse unterworfen und die Ergebnisse durch multiple Sequenzalignments überprüft und in Abb.10 dargestellt.

FlaB2	MKKGAI GIGTLIVFI AMVLVAAVAAGVLIATSGYLQQKAMATGRQTTQEVASGIKVTGVF 60
Sequenz 1	---- AVGIGTLIVFIA ----- 12
	*:*****
FlaB2	GYINGTPPGASNISRIVIYVAPNAGSSGIDLRYVKIVLSDGKRMVYRYDPKEDGSSDL 120
Sequenz 1	-----
FlaB2	KPEYIHYKGDIPNIFAYGEWEPYYKNKKPQISGEYITDNINVSAVWWNLYSAYNNSKLL 180
Sequenz 1	-----
FlaB2	FGIAVVQDGDNSLSDPQHPTLSWGLAALMIWTFPFDDDDNNISNGFGLRPGTKIIGKVIP 240
Sequenz 1	-----
FlaB2	ESGAAGVIDFTTPSTYTQNLMELO 264
Sequenz 1	-----

Abbildung 10: Falsche Zuordnung zu FlaB2 oder Mutation?

Sequenzidentitäten wurden schwarz hinterlegt und sind nochmals mit einem Stern gekennzeichnet, konservative Sequenzsubstitutionen sind dunkelgrau hinterlegt und werden durch einen Doppelpunkt gekennzeichnet. Die Analyse wurde mit dem Programm ClustalW durchgeführt.

Die *exakte* Sequenzabfolge konnte in der bei NCBI (NCBI: AE009950; Maeder *et al.*, 1999; Robb *et al.* 2001) hinterlegten Genom-Datenbank von *P. furiosus* weder für die Flagellin-Proteine FlaB1 noch FlaB2 gefunden werden. Möglich erschien hier im multiplen Sequenzalignment mit FlaB2 auf den ersten Blick ein Basenpaaraustausch. Dieser könnte sich auf die Kodierung der Aminosäure an Position 6 auswirken, und zu der nachgewiesenen Aminosäure Valin statt dem postulierten Isoleucin führen. Der Start der Sequenzierung an Position 5 statt 2 ist auf die Abspaltung des Signalpeptides vom Preprotein zurückzuführen (Faguy *et al.*, 1994), somit wurde nur noch die N-terminale Sequenz des *reifen* Proteins ansequenziert (s.a. Abb.13).

Der Bereich stromaufwärts des FlaB2-Gens und das Gen selbst wurden, wie unter III.A.4.2 beschrieben, mehrfach nachsequenziert, um die Ursache der oben beschriebenen „Aminosäure-Verschiebung“ aufzuklären. Dabei konnte gezeigt werden, dass es sich bei dem Protein der Flagellenisolierung, wie im Anschluss beschrieben, um das in dieser Arbeit

neu nachgewiesene und als FlaB0 benannte Protein handelte (vgl. III.A.4.2 und III.B.1). Die beiden anderen Flagellenproteine, FlaB1 und FlaB2 liegen vermutlich in so geringer Menge in der Gesamtflagellenpräparation vor, dass ihre Sequenz beim Edman-Abbau nicht nachweisbar war. Ein multiples Sequenzalignment der Sequenz 1 mit dem Protein FlaB0 zeigt eine komplette Übereinstimmung mit der ermittelten Sequenz 1 (Abb.11).

```

FlaB0      MAKKGAVGIGTLIVFIAMVLVAAVAAVLIQTSGYLQOKSQATGAETTQEVASGIKVLVS 60
Sequenz 1  -----AVGIGTLIVFIA----- 12
            *****

FlaB0      VGKTDSNKTYVEKLAIYISPNAGSEQIDLNNTRVVLSTNGTVQAVLKYEKTAYHKGAVGDV 120
Sequenz 1  -----

FlaB0      FNASTAWNLSNTNFGIIVLQDADNSVDQNYPTLNKGDIVVITVKVGEENGVFVGKGIPT 180
Sequenz 1  -----

FlaB0      KITGKVIPEFQAPGVIEFTTPSTYTSEVIELQ 212
Sequenz 1  -----

```

Abbildung 11: Eindeutige Zuordnung von Sequenz 1 zu FlaB0

Sequenzidentitäten sind schwarz hinterlegt und nochmals mit einem Stern gekennzeichnet. Analyse mit ClustalW.

Es musste zusätzlich untersucht werden, ob dennoch eines der zwei weiteren Flagellinproteine, FlaB1 oder/und FlaB2, das (die) Hauptprotein(e) der isolierten Flagellenfraktion darstellt(en). Diese könnten möglicherweise nicht durch eine N-terminale Sequenzierung nachgewiesen werden, falls eine Blockierung des N-Terminus durch eine posttranslationale Modifizierung vorläge (Eichler *et al.*, 2005; Ng *et al.* 2006). Deshalb wurde der Sequenzierungsansatz unter Verwendung von Trypsin hydrolysiert und mittels MALDI-TOF³ und HPLC⁴ analysiert (K. Dietl, 2006). Die gefundene **Sequenz 2** stimmte ausschließlich mit FlaB0 überein. Die ClustalW-Analysen sind im Anhang (VIII.1) aufgeführt.

Sequenz 2

AIYISP

Die Bande mit dem Molekulargewicht von 21 kDa ergab durch N-terminale Sequenzierung die aufgeführte **Sequenz 3**. Mittels einer Blast-Analyse konnte gezeigt werden, dass es sich um Rubrerythrin handelt, welches anscheinend in allen Flagellenpräparationen mit aufgereinigt wird, obwohl es sich mit großer Wahrscheinlichkeit um ein cytoplasmatisches Protein handelt.

Sequenz 3

VVKRTMTKKF

Eine Analyse der Proteinbande mit einem Molekulargewicht von 90 kDa ergab durch N-terminale Sequenzierung die unten gezeigte **Sequenz 4**. Eine exakte Zuordnung der

³ MALDI-TOF: Matrix Assisted Laser Desorption/Ionisation-Time of Flight

⁴ HPLC: High Performance/Pressure Liquid Chromatography

Sequenz zu einem Protein erwies sich als schwierig, da durch die Datenbankrecherche zwei Proteine gefunden werden konnten, die einen identischen N-Terminus aufweisen. Es handelt sich um das Protein des *mlrA*-Gens bzw. die PEP-Synthase von *P. furiosus*. Diese Ähnlichkeiten im untersuchten Abschnitt zwischen diesen beiden Proteinen wurden bereits durch Robinson *et al.* (1994) beschrieben.

Sequenz 4

AYRFIKWFEELSKNDV

Eine weitere Bande bei 25 kDa ergab ebenfalls die oben aufgeführte **Sequenz 1**. Ein Vergleich mit den tatsächlichen Molekulargrößen der einzelnen Flagellenproteine legte nahe, dass es sich vermutlich um die unglykosylierte Form des Flagellinproteins handelte. Eine PAS-Färbung, die zu keinem Signal führte, unterstützte diese Hypothese (Dietl, 2006).

In der folgenden Tabelle sind die wichtigsten Daten aller Proteinsequenzierung zusammengefasst.

Protein	Aminosäureanzahl	Proteinmasse/ kDa	
		theoretisch	nachgewiesen (per SDS-PAGE)
FlaB0	212	ca. 23	25 – 30
FlaB1	214	ca. 23	?
FlaB2	264	ca. 29	?
PEP-Synthase	817	ca. 90	90
Protein MlrA	794	ca. 87	90
Ruberythrin	171	ca. 19	21

Tabelle 16: Ergebnisse der Proteinsequenzierungen

4.2 Nachsequenzierung der genomischen DNA

Wie bereits unter III.A.4.1 ausgeführt, entsprach die erhaltene N-terminale Sequenz des isolierten Flagellenproteins nicht den Angaben aus der Datenbank von NCBI. Es wurde zunächst eine möglicherweise vorliegende Mutation im Gen *flaB2* angenommen. Um dies zu überprüfen, sollte der entsprechende Bereich durch mehrere, sich überlappende Sequenzierungen abgedeckt werden. Hierbei ergab sich, dass die in der Datenbank (NCBI: AE009950; Maeder *et al.*, 1999; Robb *et al.* 2001) hinterlegte Sequenz fehlerhaft ist und der Bereich wesentlich größer als angegeben. Es konnte ein zusätzlicher Abschnitt mit einer Größe von 771 bp gefunden werden, der zwischen den Positionen 352384 und 352385 im Genom ergänzt werden muss. Die Nummerierung dieses neuen Abschnittes erfolgte zunächst mit den Bezeichnungen 352384.1 – 352384.771. Der neu hinzugefügte Abschnitt und die angrenzenden Bereiche wurden mit dem Programm BioEdit (Hall, 1999) auf potentielle offene Leserahmen hin untersucht. Es wurde berücksichtigt, dass im Genom von *P. furiosus* neben dem Startcodon ATG, dass in 85% der Fälle genutzt wird, auch zu 10% das Startcodon GTG bzw. zu 5% TTG vorliegen kann (Torarinsson *et al.*, 2005). Somit

konnten innerhalb des neu hinzugefügten Genomabschnitts 7 potentielle offene Leserahmen nachgewiesen werden. In Hinblick darauf, dass ein Protein in der Nähe des bereits klassifizierten Flagellings *flaB2* ein ähnliches Signalpetid wie dieses, bzw. alle anderen bereits klassifizierten archaeellen Flagelline besitzen sollte (Kalmokoff *et al.*, 1991; Correia *et al.*, 2000), konnte für *flaB1* ein neuer offener Leserahmen festgelegt werden (Abb.12), welcher ein N-terminales Signalpeptid enthielt. Die Benennung *flaB1* wird weiterhin beibehalten, wobei in folgenden Abbildungen die ursprüngliche Genbezeichnung PF0336 *nicht* mehr verwendet wird. Durch die Analysen der offenen Leserahmen konnte ein weiteres Protein, das stromabwärts des bereits annotierten Gens *met* (PF0339) und stromaufwärts des neu annotierten Proteins *flaB1* liegt, nachgewiesen werden. Der Chronologie halber erhält es den Namen *flaB0*. Es besitzt, wie die anderen *flaB*-Proteine eine Signalsequenz. Außerdem konnte, wie oben gezeigt (vgl. Sequenz 1 und 3), das Protein FlaB0 mittels verschiedener Proteinsequenzierungen in den Flagellenpräparationen als Hauptflagellin nachgewiesen werden.

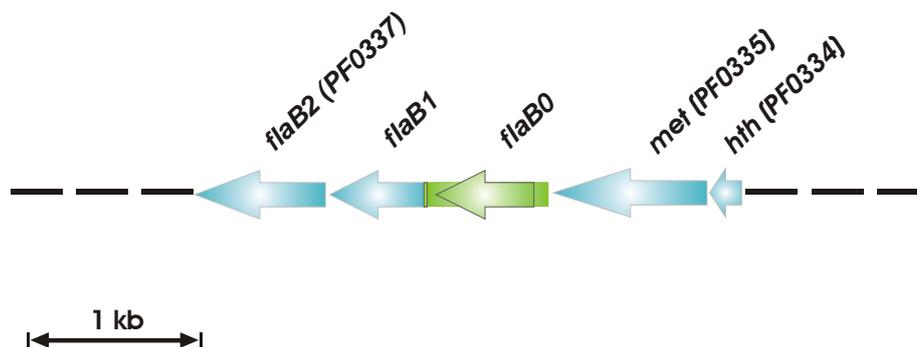


Abbildung 12: Darstellung des vervollständigten *fla*-Genclusters

Die farbig unterlegten Pfeile geben maßstabsgetreu die Anordnung der Gene des *fla*-Genclusters wieder, wobei die Polarität der Pfeile der Transkriptionsrichtung entspricht. Der grün hinterlegte Teil entspricht dabei dem nachsequenzierten, neu hinzugefügten Genomabschnitt. Darin befand sich der Transkriptionsstart von *flaB1* und das vollständige *flaB0*-Gen. Die Bezeichnungen wurden der Datenbank von NCBI entnommen; *flaB0* und *flaB1* sind ohne Genbezeichnungen aufgeführt, da sie aufgrund des Sequenzeinschubes nicht mehr den (vorhandenen) Originalangaben entsprechen.

4.3 Sequenzvergleiche und computergestützte Sekundärstrukturanalysen

Die Flagelline der Archaeen besitzen im Aufbau der Sequenz eine sehr große Ähnlichkeit (Thomas *et al.* 2001). Deshalb wurden zunächst die Flagelline von *P. furiosus* untereinander verglichen (es wurde das Programme ClustalW (Higgins, 1994) zum multiplen Sequenzalignment und SignalP 3.0 (Nielsen *et al.*, 1997; Bendtsen *et al.*, 2004) zur Analyse des Signalpeptids verwendet).

Der Vergleich der Proteine zeigt eine starke Konservierung, wobei sich die Ähnlichkeit besonders im N-terminalen Bereich zeigt. Auch der mittlere Teil und der C-Term weisen eine hohe Erhaltung von Aminosäuren auf. Bezieht man noch die konservativen Aminosäureaustausche ein, die in Abb.13 lediglich durch Doppelpunkte und Punkte gekennzeichnet wurden, ergibt sich eine sehr starke Homologie zwischen den drei Flagellinen.

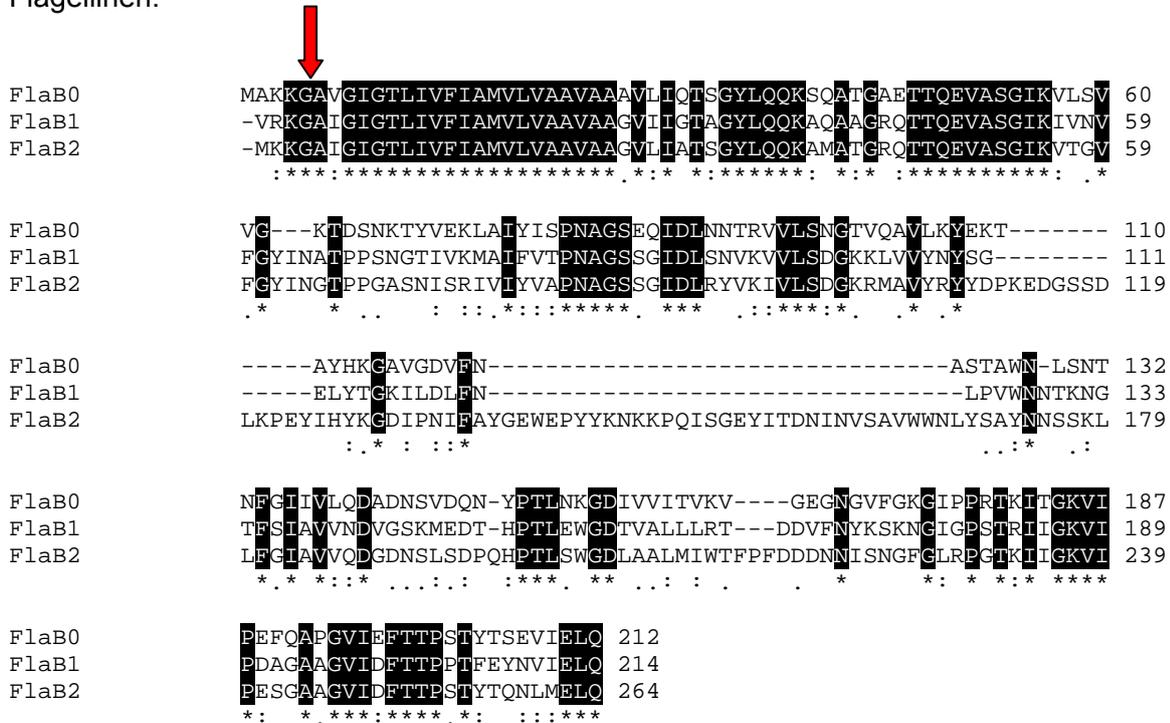


Abbildung 13: Vergleich der Strukturflagelline FlaB0, FlaB1 und FlaB2 von *P. furiosus*. Sequenzidentitäten sind schwarz unterlegt und zusätzlich mit einem Stern gekennzeichnet. Die Doppelpunkte unter dem jeweiligen Alignment geben konservative, die Punkte semi-konservative Sequenzaustausche wieder. Der Übersichtlichkeit halber wurden diese Austausche nicht farblich markiert. Der rote Pfeil gibt die nachgewiesene bzw. vorausgesagte Schnittstelle der Signalpeptidase wieder.

Eine Analyse zur Sekundärstruktur wurde mit dem Programm PredictProtein (Rost, 2005) durchgeführt. Das Ergebnis und die Zusammenstellung der postulierten Sekundärstrukturen der drei Flagelline ist im Anhang (VIII.2) aufgeführt. Hier ist die starke Konservierung der Aminosäuren natürlich auch in Form der vorhergesagten Sekundärstruktur erkennbar. Insbesondere der N-Terminus aller drei Proteine zeichnet sich durch zwei α -Helices aus. Der Mittelteil und der C-Term bildet hingegen laut Voraussage nur β -Faltblätter aus.

Die bereits beschriebene Homologie innerhalb der archaellen Flagelline trifft auch im Vergleich der drei *P. furiosus*-Flagelline mit Flagellenproteinen beispielsweise der anderen *Pyrococccen* bzw. *Thermococcales* oder *Methanococcus sp.* (Daten nicht gezeigt).

Des Weiteren wurde ein Vergleich mit Pilinen wie den Typ IV Pili von Gram-negativen Bakterien durchgeführt. Ähnlichkeiten bezüglich der archaellen Flagelline und der

bakteriellen Piline waren bereits diskutiert worden (Gerl *et al.*, 1988; Faguy *et al.*, 1994). Deshalb wurden die in der Datenbank von NCBI als Piline ausgezeichneten Proteine von *Pseudomonas aeruginosa* mit den Flagellinen von *P. furiosus* verglichen. In Abb. 14 ist als Beispiel das multiple Sequenzalignment der drei Strukturflagelline von *P. furiosus* mit Pile gezeigt, alle weiteren durchgeführten Analysen können dem Anhang (VIII.3) entnommen werden.

```

FlaB0      MAKKGAVGIGTLIVFIAMVLVAAVAALVLIQTSGYLQOKSQATGAETTOEVASGIKVLVS 60
FlaB1      -VRKGAIGIGTLIVFIAMVLVAAVAAGVLIIGTAGYLQOKAQACRQTTQEVASGIKIVNV 59
FlaB2      -MKGGAIGIGTLIVFIAMVLVAAVAAGVLIATSGYLQOKAMATGRQTTQEVASGIKVTGV 59
Pile       -MRTRQKGFLLLEMVVVVAVIGILLGIALPSYQNYVIRSNRIEQALLSDAAA----- 52
           : . * : * : . . . . . : . . : . * : . : * . . . * :

FlaB0      VG---KTDNKTVEKLAIVISPNAGSEQIDLNNTRVVLSSNGTVQAVLKYEKT----- 110
FlaB1      FGYINATPPSNGTIVKMAIFVTPNAGSSGIDLSNVKVVLSGKKLVVYNYSGE----- 112
FlaB2      FGYINGTPPGASNISRIVIVVAPNAGSSGIDLRVVKIVLSDGKRMAVYRYYPKEDGSSD 119
Pile       -----RQERYYSQNPQ-VGYTKDVAKLGMSAN----- 79
           : : : * . * . . . . . : : : * . . .

FlaB0      -----AYHKGAVGDVFN-----ASTAWNLSNTN----- 133
FlaB1      -----LYTGKILDLFN-----LPVWNNTKNGT----- 134
FlaB2      LKPEYIHYKGDIPNIFAYGEWEPYKKNKQPISGEYITDNINVSAVWWNLAYSAYNNSKL 179
Pile       -----SPNNLYN----- 86
           : : :

FlaB0      -FGIIVLQDADNSV-DQNYPTLNKGDIVVITVKVG----EGNGVFGKGIPRRTKITGKVI 187
FlaB1      -FSIAVVNDVGSKM-EDTHPTLEWGDVALLLRTD---DVFNYKSKNGIGPSTRITIGKVI 189
FlaB2      LFGIAVVQDGDNSLSDPQHP TLSWGDLAALMIWTFPFDDDDNNISNGFGLRPGTKITIGKVI 239
Pile       --LTIATPTSTTYTLTATP-----INSQTRDKTCGKLTNLQL 121
           : : . . . * . . . . . : : : : :

FlaB0      PEFQAPGVIEFTTPSTYTSEVIELQ 212
FlaB1      PDAGAAGVIDFTTPPTFEYNVIELQ 214
FlaB2      PESGAAGVIDFTTPSTYTQNLMEIQ 264
Pile      GERGAACKTGNNSTVNDWCW----- 141
           : * . * . . . .

```

Abbildung 14: Vergleich der Strukturflagelline von *P. furiosus* mit Pile von *P. aeruginosa*. Zur Zeichenerklärung siehe Beschreibung in Abbildung 12. Konservative und semi-konservative Sequenzaustausche wurden zusätzlich farbig unterlegt.

Die Konservierung fällt weniger stark aus, als postuliert und erwartet wurde (Faguy *et al.*, 1994a). Der N-Terminus ist im Hinblick auf die Archaeen-internen Vergleiche sehr viel weniger konserviert, doch finden sich über den gesamten Proteinbereich konservative und semi-konservative Aminosäure-Austausche, die für eine ähnliche Funktion sprechen.

5. Klonierung der (Struktur)Flagellin-Gene und deren Expression

Da zunächst vermutet wurde, dass es sich bei FlaB2 um das Hauptstrukturprotein der Flagelle handelt, wurde versucht dieses in den Expressionsvektor pET 14b und pET 15b zu klonieren und das Protein nach der Transformation im *E. coli*-Stamm BL21 (DE3) pLysS zu exprimieren. Es wurden in mehreren Versuchsläufen kaum Klone erhalten. Falls Klone vorhanden waren, erwiesen sich diese als negativ, d.h. das gewünschte Gen befand sich

nicht im aufgenommenen Plasmid. In Versuchen, dieses Protein in einem eukaryotischen Expressionssystem, dem *Kluyveromyces latis*-System, zu klonieren und exprimieren, zeigte sich nach der Induktion eine zunehmende Lyse der Hefezellen (Dietl, 2006). Das exprimierte Protein schien sich toxisch auf die Expressionszellen auszuwirken (Dietl, 2006).

Deshalb wurde eine Strategie entworfen, die zum Einen zeigen sollte, welcher Teil des Proteins sich eventuell toxisch auswirkt und die des Weiteren zu exprimierten Peptidfragmenten führen sollte, die jeweils spezifisch für das entsprechende Flagellin FlaB0, FlaB1 oder FlaB2 waren. Das multiple Sequenzalignment (Abb.13) macht deutlich, dass die Konservierung der Proteine untereinander sehr hoch ist. Der "mittlere Teil" der drei Strukturflagelline zeigt weniger Konservierungen, als die N- oder C-Termini der Proteine. Durch Verwendung von polyklonalen Antikörpern, welche gegen diesen „Mittelteil“ generiert wurden, sollte es ermöglicht werden, die einzelnen Flagelline in Experimenten wie z.B. einer Immunmarkierung für die Mikroskopie oder Immunoblots unterscheiden zu können.

"N-TERMINUS"

FlaB0	MAKKGAVGIGTLIVFIAMVLVAAVAAGVLIQTSYLOOKSOATCAETTQEVASGIKVLVS	60
FlaB1	-VRKGAIGIGTLIVFIAMVLVAAVAAGVLIIGTAGYLOOKAQAGRQTTQEVASGIKIVNV	59
FlaB2	-MKGGAIGIGTLIVFIAMVLVAAVAAGVLIATSGYLOOKAMATCRQTTQEVASGIKVTGV	59
	:***:*****.*:* *:*****: *:* :*****: .*	
FlaB0	VG---KTDNKNKYVEKLAIFYISPAGSEQIDLNNTRVVLVSNQITVQAVLKYEKT-----	110
FlaB1	FGYINATPPSNGTIVKMAIFVTPNAGSSGIDLNVKVVLSGKGLVYVNYSG-----	111
FlaB2	FGYINGTTPPGASNISRIVIVYVAPNAGSSGIDLRVVKIVLSGKRMAYRYDYPKEDGSSD	119
	. * * . . : : . * : : * * * * . * * * . : : * * * : * . * . *	

"MITTELTEIL"

FlaB0	VG---KTDNKNKYVEKLAIFYISPAGSEQIDLNNTRVVLVSNQITVQAVLKYEKT-----	110
FlaB1	FGYINATPPSNGTIVKMAIFVTPNAGSSGIDLNVKVVLSGKGLVYVNYSG-----	111
FlaB2	FGYINGTTPPGASNISRIVIVYVAPNAGSSGIDLRVVKIVLSGKRMAYRYDYPKEDGSSD	119
	. * * * . . : : . * : : * * * * . * * * . : : * * * : * . * . *	
FlaB0	-----AYHKGAVGDVFN-----ASTAWN-LSNT	132
FlaB1	-----ELYTKILDLFN-----LPVWNNTKNG	133
FlaB2	LKPEYIHYKGDIPNIFAYGEWEPYKKNKPQISGEYITDNINVSAVWWNLYSAYNNSKLL	179
	:.* : : * . . . : : * . . . : : * . . . : : * . . . : : * . . . : : *	
FlaB0	NFGIIVLQDADNSVDQN-YPTLNKGDIVVITVKV---GEGNVVFGKGIIPRTRKITGKVI	187
FlaB1	TFSTIAVVNDVGSKMEDT-HPTELEWCDTVALLLRT---DDVFNYKSNIGIGPSTRIIGKVI	189
FlaB2	LFGIAVVQDGDNSLSDPQHPTELEWCDTVALLLRT---DDVFNYKSNIGIGPSTRIIGKVI	239
	* . * * : : * . . . : : * . . . : : * . . . : : * . . . : : * . . . : : *	

"C-TERMINUS"

FlaB0	-----AYHKGAVGDFVN-----ASTAWN-LSNT	132
FlaB1	-----ELYTGKILDLFN-----LPVWNNTKNG	133
FlaB2	LKPEYIHYKGDIPNIFAYGEWEPYKKNKKPQISGEYITDNINVSAVWWNL	SAYNNSSKL 179
	:.* : : : *	.. : * .. :
FlaB0	NFGIIVLQDADNSVDQN-YPTLNKGDIVVITVKV---GEGNGVFGK	GIPPRITIGKVI 187
FlaB1	TFSIAVNDVGSKMEDT-HPTLEWGDIVALLRT---DDVFNYSKNG	GIPSTRITIGKVI 189
FlaB2	LEFGIAVVDGDNLSLSDPQHPTLSWGDLAALMIWTFPFDDNNISNGF	GLRPGITIGKVI 239
	. * : : * : : * * . * . . . : . . . *	* : * * : * * * * *
FlaB0	PEFQAPGVIEFTTPSTYTSEVIELQ	212
FlaB1	PDAGAAGVIDFTTPPTFEYNVIELQ	214
FlaB2	PESGAAGVIDFTTPSTYTQNLMEIQ	264
	* : * . * * : * * * * . * : : : * * *	

Abbildung 15: Klonierungsstrategie für eine möglichst große Variabilität der zu generierenden Antikörper: Unterteilung der Flagellinproteine in N-Terminus, Mittelteil und C-Terminus

Sequenzidentitäten (*) sind schwarz gekennzeichnet, die Doppelpunkte unter dem jeweiligen Alignment geben konservative, die Punkte semikonservative Sequenzaustausche wieder. Der Übersichtlichkeit halber sind diese Austausch nicht farbig markiert.

Abb.15 zeigt, nach welchen Kriterien die als "N-Terminus", "Mittelteil" und "C-Terminus" bezeichneten Teilabschnitte ausgewählt wurden. Die Klonierung des Mittelteils von FlaB0 und FlaB1 waren Bestandteil dieser Arbeit. Die Sequenzvergleiche für FlaB2 wurden unabhängig davon von Nadin Wimmer vorgenommen. Die Beurteilung wurde anhand eines *Archaeen*-übergreifenden multiplen Sequenzalignments getroffen (N. Wimmer, 2007). Die ausgewählten, klonierten Teilabschnitte von FlaB2 stimmen deshalb nicht komplett mit den konservierten bzw. weniger konservierten Bereichen innerhalb des Alignments zwischen den *Pyrococcus*-Strukturflagellinen überein. Der in dieser Arbeit klonierte Mittelteil für FlaB0 und FlaB1 wurde dann als 'FlaB0' und 'FlaB1'⁵ bezeichnet und in den Vektor pQE30, ein low copy Plasmid, kloniert. Nach Transformation in die *E. coli*-Stämme BL21 (DE3) pLysS, BL21 Star (DE3) LysS und Rosetta (DE3) LysS wurde mittels IPTG induziert und so das gewünschte Protein exprimiert. Allein die Transformation in den Expressionsstamm BL21 Star (DE3) LysS führte zu positiven Klonen. Alle Klone wurden mittels der pQE-spezifischen Primer pQE30_f und pQE30_r durch Sequenzierung im Rahmen einer Kolonie-PCR kontrolliert. Für alle ausgewählten Klone von 'FlaB0' wurde ein doppelter Basenaustausch im letzten Triplet nachgewiesen, was zum Austausch der Aminosäure Glycin zur Aminosäure Leucin führte. Dies sollte für die anschließende Generierung von Antikörpern aber nicht störend wirken, da es sich um einen konservativen Austausch handelt. Die Sequenzierung von 'FlaB1' zeigte, dass hier keine Austausche vorlagen. Das gesuchte rekombinante Protein fand sich in beiden Fällen nach der Induktion jeweils in den Einschlusskörperchen (inclusion bodies) und wurde über eine Nickelsäule affinitätsgereinigt.

⁵ Zeichenerklärung zur Benennung der Proteinabschnitte bzw. der verwendeten polyklonalen Antikörper: 'FlaXY' gibt an, dass es sich um den mittleren Teil des ursprünglichen Proteins handelt.

Eine elektronenmikroskopische Analyse der jeweiligen Expressionszellen ergab keine äußeren morphologischen Veränderungen.

6. Immunologische Untersuchungen

Es standen mehrere Antikörper zur Verfügung, die gegen verschiedene Peptidabschnitte der drei Flagelline gerichtet waren. Im Rahmen dieser Arbeit wurden polyklonale Antikörper generiert, die gegen 'FlaB0' und 'FlaB1' gerichtet waren. Auf diese, auch als „Mittelteile“ bezeichneten Abschnitte des ursprünglichen Proteins, wurde dabei besonderes Augenmerk gelegt, da sich die Mittelteile im Vergleich zwischen den drei Flagellinen FlaB0, FlaB1 und FlaB2 am stärksten unterschieden (Abb.15). Zudem wurden polyklonale Antikörper generiert, die gegen die Gesamtflagellen-Präparation (anti-Fla Pfu; Abb.4 und 7) gerichtet waren.

Des Weiteren standen polyklonale Antikörper zur Verfügung, die sich gegen 'FlaB2' und 'FlaB2⁶' richteten (N. Wimmer, 2007).

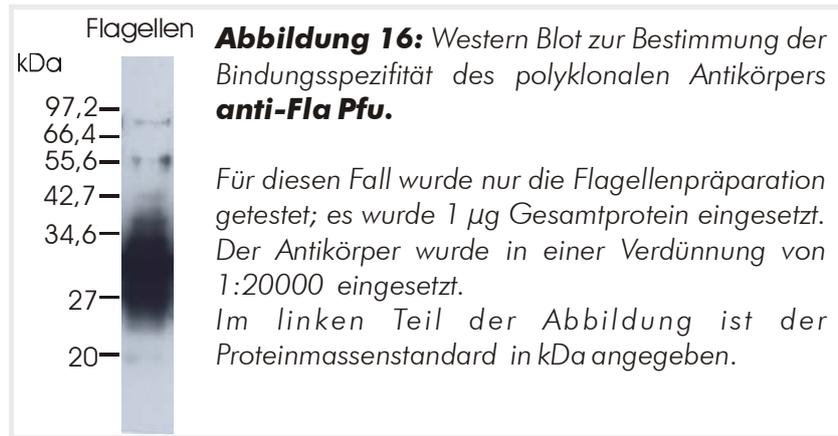
In der folgenden Tabelle sind der Übersichtlichkeit halber die Molekulargrößen der (rekombinanten) Proteine. Die Tabelle soll den Vergleich zwischen den erwartenden und nachgewiesenen Signalen erleichtern.

Bezeichnung	Proteinmasse
anti-Fla Pfu (Gesamtflagellenpräparation)	27 kDa
anti-'Fla B0'	6,5 kDa
anti-'Fla B1'	6,5 kDa
anti-'Fla B2'	6,5 kDa
anti-'Fla B2	6,5 kDa

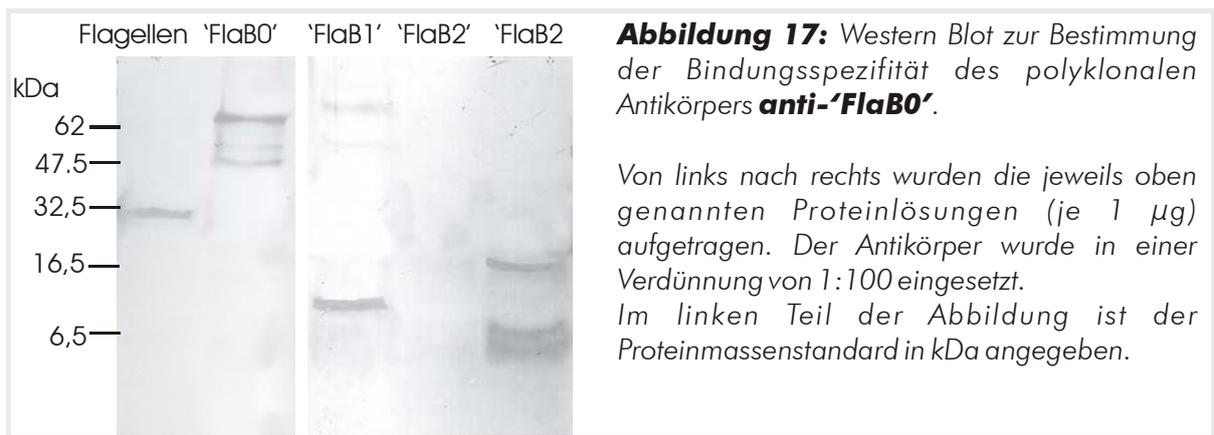
Tabelle 17: Theoretische Proteinmassen der für die Immunisierung verwendeten Proteine.

Die Bindungsspezifität der entsprechenden generierten Antikörper sollte getestet werden. Anti-Fla Pfu wurde nur gegen die Original-Flagellenpräparation getestet, die zur Immunisierung genutzt wurde. Die Antikörper, die anhand der rekombinanten Proteine der unterschiedlichen Flagelline generiert wurden, wurden gegen alle verfügbaren rekombinanten Flagellin-Abschnitte und an der Original-Flagellen-Präparation getestet.

⁶ **FlaXY** gibt an, dass N-terminal gesehen vom ursprünglichen Protein ein Teil fehlt, in diesem Fall wurde nur der C-Terminus (ohne den N-Terminus und den Mittelteil) per Expression gewonnen und zur Erzeugung von polyklonalen Antikörpern genutzt.



Anti-Fla Pfu markiert hauptsächlich eine Bande mit einer Molekularmasse ca. 30 kDa. In frischen Flagellenpräparationen konnten zudem Banden bei (21 kDa,) 60 kDa und 90 kDa mittels der Antikörper markiert und detektiert werden (nicht gezeigt). Wurden die Präparationen über längere Zeit gelagert (sowohl bei 4°C oder durch Lagerung bei -20°C) konnte nur noch die Bande mit einem Molekulargewicht von 30 kDa detektiert werden (Abb.16).



Anti-'FlaB0' markiert die Gesamtflagellenpräparation bei 30 kDa. Für das rekombinante 'FlaB0' sind Proteine mit einer Proteinmasse von 65 kDa und auch 48 kDa markiert; für 'FlaB1' findet sich eine Markierung in Höhe von ca. 13 kDa. Der rekombinante Mittelteil von 'FlaB2' wies keine Reaktion auf, der C-Terminus 'FlaB2' zeigt Banden bei ca. 6,5 und 18 kDa. Bei allen Banden, die bei den rekombinanten Proteinen mit einer größeren Proteinmasse als 6,5 kDa markiert sind, handelt es sich mit großer Wahrscheinlichkeit um Multimere desselben.

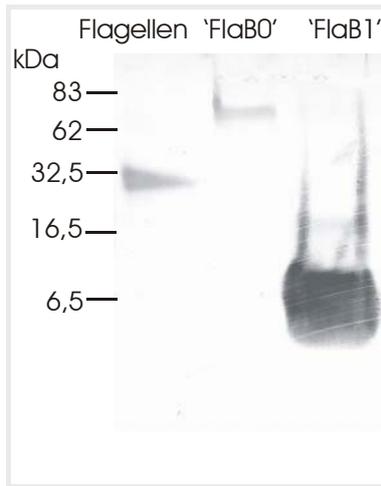


Abbildung 18: Western Blot zur Bestimmung der Bindungsspezifität des polyklonalen Antikörpers **anti-'FlaB1'**.

Von links nach rechts wurden die jeweils genannten Proteinlösungen (je 1 µg) aufgetragen. Da für 'FlaB2' und 'FlaB2' kein Signal nachgewiesen werden konnte, wurde auf die Abbildung verzichtet. Die Detektion erfolgte mit einer 1:200-Verdünnung des Antikörpers. Links in der Abbildung sind die Proteinmassen in kDa angegeben.

Anti-'FlaB1' Antikörper zeigt in der Gesamtflagellenpräparation Reaktionen bei 30 kDa. Für das aufgetragene rekombinante 'FlaB0' wurde wiederum eine Bande in Höhe von 65 kDa nachgewiesen. Für das rekombinante 'FlaB1' wurde eine sehr eindeutige und schmierende Bande bei der erwarteten Größe von 6,5 kDa nachgewiesen. Keines der rekombinanten FlaB2-Proteine zeigt eine Reaktion mit diesem Antikörper.

Die Ergebnisse der in den Abbildungen 16 – 18 dargestellten Immunmarkierungen sind in Tabelle 18 zur besseren Orientierung nochmals zusammengestellt.

Aufgetragenes Protein	Mit dem jeweiligen Antikörper nachgewiesene Banden (in kDa)		
	anti-Fla Pfu	anti-'FlaB0'	anti-'FlaB1'
Flagellenpräp.	30	30	30
'B0'	ND	48; 65	65
'B1'	ND	13	6,5
'B2'	ND	/	/
'B2	ND	6,5 ;18	/

Tabelle 18: Zusammengefasste Ergebnisse der Immunmarkierungen

ND: nicht durchgeführt; /: keine Reaktivität innerhalb der getesteten Parameter

Der Nachweis mit den Antikörpern FlaB0 und FlaB1 zeigt, dass sowohl FlaB0 und FlaB1 sich in der Flagellenpräparation befinden. Auffällig ist, dass es bei den rekombinanten Proteinabschnitten häufig zu einer Dimerisierung des Proteins kommt, welche durch die Immunmarkierung nachgewiesen werden.

7. Biophysikalische Charakterisierung

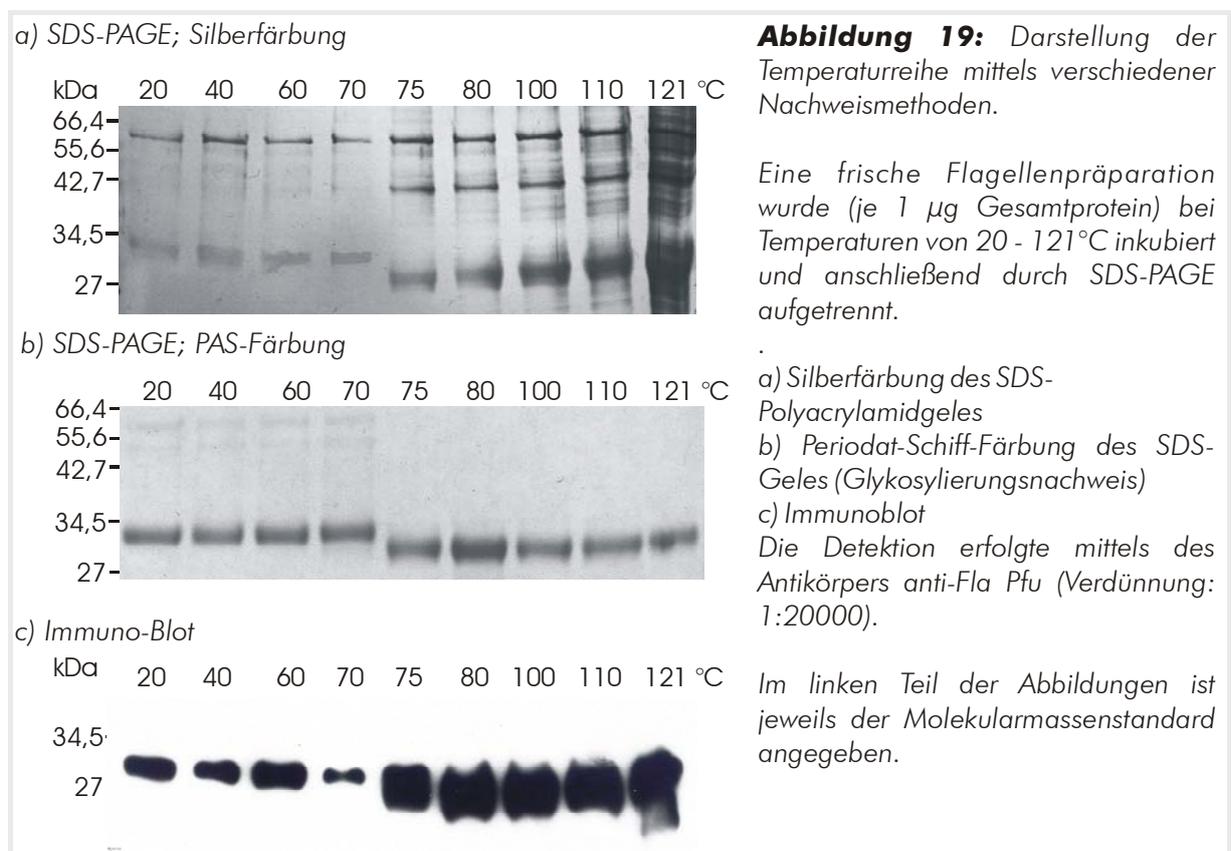
Da *P. furiosus* unter extremen Bedingungen lebt, wurde die Stabilität der Flagellen getestet.

Um die im jeweiligen Versuch erhaltenen Ergebnisse vergleichen zu können, wurde die Anzahl und Länge der Flagellen im Vergleich zum jeweiligen Standardmodell bei 20°C, pH 7 und ohne Zugabe von Detergentien in Relation gesetzt. Für eine größtmögliche Streuung der Daten wurden jeweils 50 zufällig angefertigte EM-Bilder der gleichen Vergrößerungsstufe ausgewertet.

7.1 Einfluss der Temperatur

Der Einfluss verschiedener Temperaturen auf die Stabilität der Flagellen wurde durch Inkubation (15 min; 1h; 2h) in verschiedenen Puffern bei Temperaturen von 20 – 121°C getestet. Der Temperaturbereich sollte unter und über den Bedingungen des natürlichen Systems liegen. Die Proben wurden im Elektronenmikroskop und mittels SDS-PAGE untersucht.

In Abb.19 ist ein Polyacrylamidgel auf dem die bei den unterschiedlichen Temperaturen behandelten Flagellenpräparation aufgetrennt wurden. Zusätzlich wurde auch ein Glykosylierungsnachweis und ein Immunoblot mit anti-Fla Pfu-Antikörpern durchgeführt.



Es wird deutlich, dass es bei einer Inkubationstemperatur von 75°C zu einer Verschiebung der Flagellenproteinbande von ca. 34 kDa auf 30 kDa kommt (Abb.19). Eine Immunmarkierung dieser Testreihe ergab, dass der Übergang in diesem Bereich fließend ist (Abb.19c). Bei 121°C zeigt sich zudem zunehmend eine Degradierung der Proteine, wobei die Proteine vergleichsweise sehr hohe Stabilität aufwiesen. Auch nach einer zweistündigen Inkubation bei 121°C ergab sich ein ähnliches Bild wie in der obigen Abb.19. Durch einen Immunoblot konnten im Regelfall nur die 30/34 kDa-Proteine markiert werden, ein Nachweis einer 60 kDa-Bande gelang nur mit frischen Flagellenisolierungen (vgl. auch III.A.1.1 und III.A.2). Dies ist auch der Fall für den Nachweis der Glykosylierung mittels PAS-Färbung (vgl. III.A.3). In Abb.19b ist eine sehr schwache Bande bei 60 kDa zu sehen, die jedoch ab

Inkubationstemperaturen von 75°C und aufwärts verschwindet. Da es sich bei dieser Bande, wie unter III.A.4.1 gezeigt, um ein Dimer des Flagellins handelt, zerfällt dieses also bei 75°C unter den beschriebenen Inkubationsbedingungen in das Monomer.

Eine Analyse mit verschiedenen Pufferansätzen, denen jeweils ein Zusatz des normalen Auftragspuffers fehlte⁷, ergibt, dass der Konformationswechsel des Proteins von 34 kDa hin zu 30 kDa vermutlich auf das SDS in dem Puffer in Kombination mit dem Aufkochen der Probe zurückzuführen ist. Wurden die Proben ohne SDS in einem sonst vergleichbaren Puffer inkubiert (es wurde *nach* dem Aufkochen noch die entsprechende Menge an SDS zugegeben, um einen vergleichbaren Lauf des Proteins im Gel zu gewährleisten) kommt es bei der späteren Analyse auf einem SDS-Polyacrylamidgel zu keiner Verschiebung hin zu einer geringeren Molekularmasse.

Eine Analyse im Elektronenmikroskop ergibt nur ungefähre Werte für die Stabilität, da die Fehlerquellen beträchtlich sein können. Bei 100°C und 121°C ergibt sich ein geschätzter Abbau der Flagellen um ca. 50%. Wurden die Proben bei den genannten Temperaturen 2h anstatt der sonst verwendeten 15 min aufgekocht, verblieben immer noch ca. 25% der Flagellen in der Lösung und konnten mittels Elektronenmikroskopie nachgewiesen werden.

Eine elektronenmikroskopische Analyse der Proben, die mit SDS⁸ aufgekocht wurden, zeigte eine vollständige Degradierung der Flagellen bei allen Temperaturstufen. Es waren keine intakten Flagellen mehr vorhanden. Es konnten nur einzelne Proteinaggregate nachgewiesen werden.

7.2 Einfluss des pH-Wertes

Die Stabilität der Flagellen wurde für pH-Werte zwischen pH 2 und pH 10 getestet. Die Proben wurden nach einer Negativkontrastierung elektronenmikroskopisch untersucht.



Abbildung 20: Elektronenmikroskopische Darstellung von Flagellen nach Inkubation in einer SME-Waschlösung (pH 4).

Die Probe wurde einer Negativkontrastierung mit Uranylacetat unterzogen.

Proben, die bei Raumtemperatur behandelt wurden, weisen die stärkste Stabilität auf. Ein genereller Trend verweist auf eine hohe Stabilität im Bereich des physiologischen pH-

⁷ Es wurde jeweils einer der folgenden Zusätze bzw. Zusatzkombinationen des „Standradauftragspuffers“ weggelassen: Bromphenolblau; SDS; β -EtSH; SDS + β -EtSH; Bromphenolblau + SDS; Bromphenolblau + β -EtSH; Bromphenolblau + β -EtSH + SDS.

⁸ Für die Elektronenmikroskopie wurde ein dem Auftragspuffer äquivalenter Puffer verwendet, dem nur Bromphenolblau fehlte, da sich dieses störend auf die Präparation auswirkte.

Optimalbereiches von *P. furiosus* (pH 5 – 9). Die Flagellen degradieren auch bei niedrigeren pH-Werten kaum. Unter der Verwendung von Puffern mit pH-Werten zwischen 3 – 4 kommt es zu einer verstärkten Strukturierung der Flagellen (Abb.20). Bei pH-Werten über pH 9 kommt es zu einer Degradierung der Flagellen um ca. 50%.

7.3 Einfluss verschiedener Salze und Detergentien

Die Auswirkungen auf die Stabilität und Struktur der Flagellen wurde unter Verwendung verschiedener Detergentien und Salze untersucht. Die so behandelten Proben wurden mittels SDS-PAGE und im Elektronenmikroskop analysiert. In der folgenden Tabelle 19 ist eine Übersicht über die Ergebnisse zusammengestellt.

Substanz/Lösung	Resultat	
	SDS-PAGE	EM
MeOH/Chloroform (1:1)	Keine Banden; Verbleib im Sammelgel/Geltaschen	Lediglich nicht näher spezifizierte Proteinaggregate
6 M Harnstoff		
3 M Harnstoff		
3 M Guanidin x HCl		
5 M Guanidin x HCl		
1% (v/v) Triton X-100	Monomere und Dimere	Sehr kurze Flagellenstücke; zumeist Proteinaggregate
1% (w/v) CTAB	Monomere und Dimere	Sehr kurze Flagellenstücke; zumeist Proteinaggregate
1% (v/v) Tween 20	Monomere und Multimere	Intakte Flagellen
1% (v/v) Tween 80	Monomere und Multimere	Intakte Flagellen
1% (w/v) Taurodeoxycholat	Keine Monomere; Doppelbande bei 90 kDa	Extrem gut strukturierte, intakte Flagellen
1 mM, 10 mM, 100 mM Na ₂ -EDTA	Keine Monomere; Doppelbande bei 90 kDa	Kein Effekt
SME- Waschlösung mit 5 mM DTT	Monomere	Extrem gut strukturierte, intakte Flagellen
SME- Waschlösung mit 10 % (v/v) β-EtSH	Monomere	Extrem gut strukturierte, intakte Flagellen

Tabelle 19: Zusammenstellung der verwendeten Substanzen

Unter Verwendung von chaotropen Substanzen wie Harnstoff oder Guanidin bzw. mit Lösungsmitteln wie dem Methanol/Chloroform-Gemisch kommt es zum vollständigen Abbau der Proteine; die Proteine verbleiben im Sammelgel. Mittels Elektronenmikroskopie konnten nur noch Proteinaggregate nachgewiesen werden.

Kaum oder keinen Effekt auf die Proteine bzw. die Struktur(ierung) der Flagelle hat die Verwendung von Detergentien bzw. von reduzierenden Agentien, wie β-Mercaptoethanol (β-EtSH) oder DTT oder des Ca²⁺-Chelators Na₂-EDTA.

Da es sich um Proteine eines hyperthermophilen Organismus handelt und die genannten reduzierenden Agentien zudem für die SDS-PAGE Verwendung finden, wurden zusätzlich zu diesen Versuchsansätze Temperaturreihen durchgeführt (Ergebnisse hierzu unter III.A.7.1).

8. Mikroskopie

8.1 Fluoreszenzmikroskopie

8.1.1 Färbung mit Alexafluor-Farbstoffen

Durch Färbung der Zellen mit Alexafluorfarbstoffen wurde mehrfach gezeigt, dass die Anfärbbarkeit der Flagellen nicht ausreicht, um sie mit der Auflösung des vorhandenen Kamerasystems darzustellen. Sichtbar wurden nur Flagellenbüschel, d.h. eine Vereinigung mehrerer einzelner Flagellen oder aber Zell-Zell-Verbindungen (vgl. hierzu auch die elektronenmikroskopischen Daten in Abschnitt III.A.8.2.1, Abb.22 und III.A.8.2.2, Abb.24).

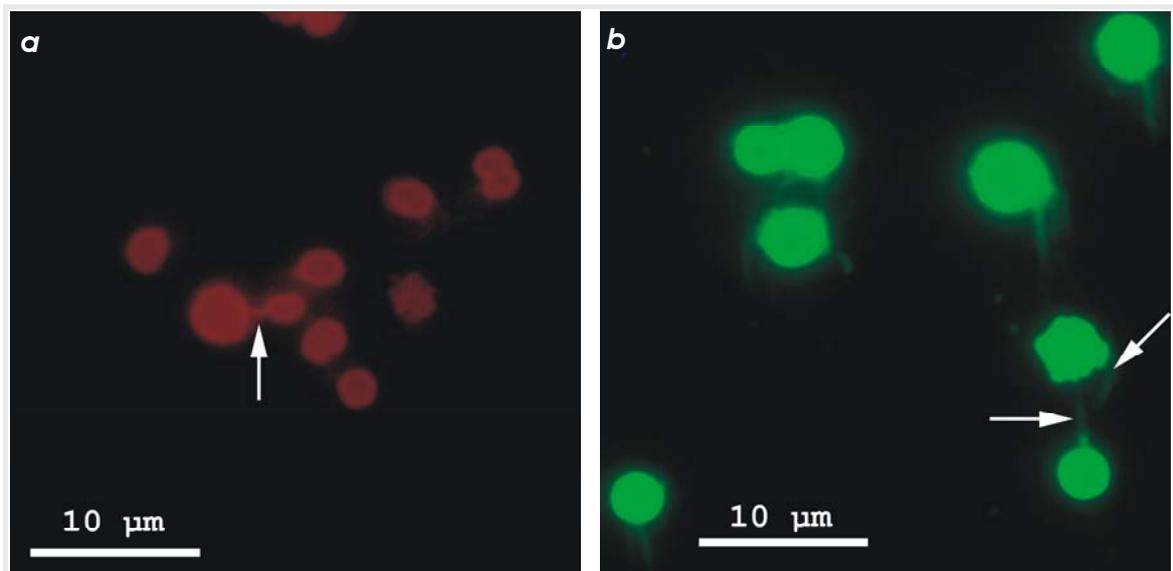


Abbildung 21: Alexa Fluor-Färbungen von *P. furiosus*-Zellen (früh stationär)

a) Färbung mit AlexaFluor 532. Der Pfeil markiert eine Zell-Zell-Verbindung.

b) Färbung mit AlexaFluor 488. Im Vergleich zu Abbildung a) wurde eine höhere Belichtungszeit gewählt, um die Flagellenbüschel sichtbar zu machen. Im unteren Teil der Abbildung ist eine Zell-Zell-Verbindung und das Flagellenbüschel an der zweiten, inserierten, Zelle mit Pfeilen markiert.

Wurden zwei Zellkulturen, die jeweils mit AlexaFluor 488 (grün) bzw. AlexaFluor 532 (rot) gefärbt wurden unter anaeroben Bedingungen äquivalent gemischt und anschließend üN bei 80°C anaerob inkubiert, so konnten keine Zell-Zell-Verbindungen nachgewiesen werden, die „gemischtfarbig“ vorlagen (die Verbindung wäre von beiden gebildet worden). Es konnten auch keine „einfarbig“ Verbindungen zwischen verschiedenfarbigen Zellen gezeigt werden (die Verbindung wäre *neu* von nur einer Zelle gebildet worden). Wenn Zell-Zell-Verbindungen nachgewiesen wurden, bestanden diese ausschließlich zwischen gleichfarbigen Zellen und wiesen dann auch diese Färbung auf.

8.1.2 Färbung mittels fluoreszenzgekoppelter Antikörper

In einem ersten Ansatz wurde versucht, die primären anti-Fla Pfu-Antikörper direkt mit dem Alexafluor-Farbstoff 488 und 555 zu koppeln. Da die Ausbeuten immer am unteren Bereich

des vom Hersteller empfohlenen Mindestmaßes von 3 – 8 Molen Farbstoff pro Mol Antikörper lagen, verliefen die Fluoreszenzmarkierungen dementsprechend ohne Erfolg.

Es wurden deshalb sekundäre Antikörper verwendet, die bereits vom Hersteller mit dem gewünschten Fluoreszenzfarbstoff gekoppelt wurden und die entsprechenden Mole Farbstoff pro Mol Antikörper aufwiesen. Die Markierung verlief ebenso erfolglos.

Wahrscheinlich liegt die Ursache hier bei einem zu geringem Markierungsgrad der (einzelnen) Flagellen, um für die Fluoreszenzmikroskopie eine sichtbare Markierung herzustellen.

8.2 Transmissionselektronenmikroskopie

8.2.1 Uranylacetatkontrastierung und Schwermetallbedampfung

Strukturelle Untersuchungen der Zellanhänge wurden mittels des Transmissionselektronenmikroskops angefertigt. Die Flagellen treten an einem Pol aus und es können bis zu 50 Flagellen pro Organismus vorkommen. Da die Flagellen innerhalb eines größeren Bereiches inserieren, gestaltete sich eine elektronenmikroskopisch detaillierte Darstellung dieser Stelle mittels der üblicherweise verwendeten Negativkontrastierung schwierig. Jedoch konnte gezeigt werden, dass die Austrittsstelle der Flagellen zumeist zu einer deutlichen Ausbuchtung der Zelle an dieser Stelle führt (Abb. 22a/b).

Bei der elektronenmikroskopischen Untersuchung von Zellhüllen konnte eine runde Struktur, aus der die Flagellen entspringen, gezeigt werden (Abb. 23a). Die Interaktion der Flagelle mit der Zellmembran, bzw. einer möglicherweise darunter liegenden Schicht konnte mit dieser Präparationsmethode nicht aufgelöst werden. Auffällig ist jedoch eine deutlich andere Strukturierung der Membran in der Region der Flagelleninsertion (Abb. 23b/c).

In einigen Fällen konnte ein weiteres, sehr viel dünneres Filament nachgewiesen werden. Die Dicke des Filaments wurde auf ca. 8 nm bestimmt (Abb. 22c/d). Zur Funktion dieses Filaments können zu diesem Zeitpunkt keine weiteren Aussagen gemacht werden.

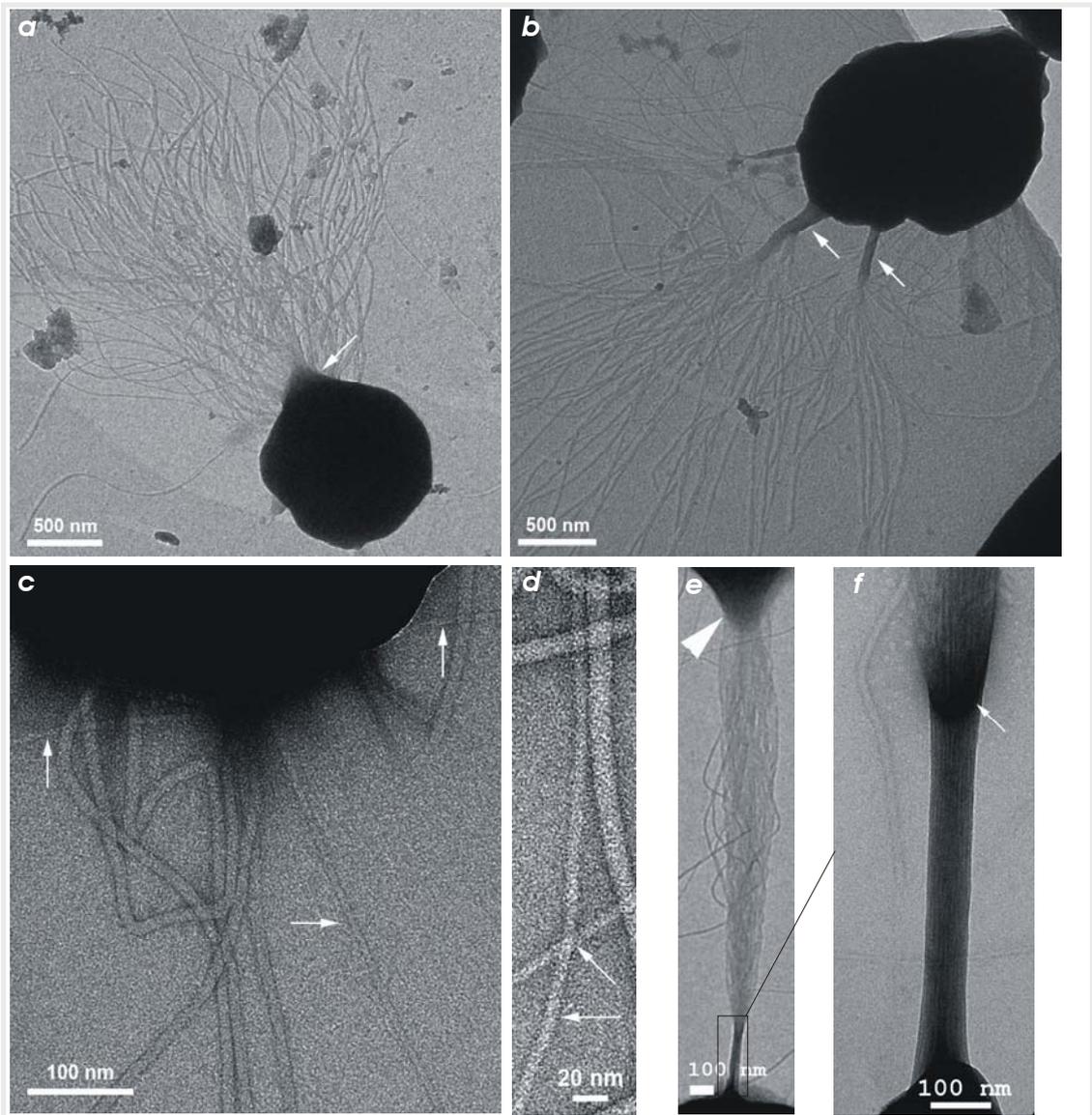
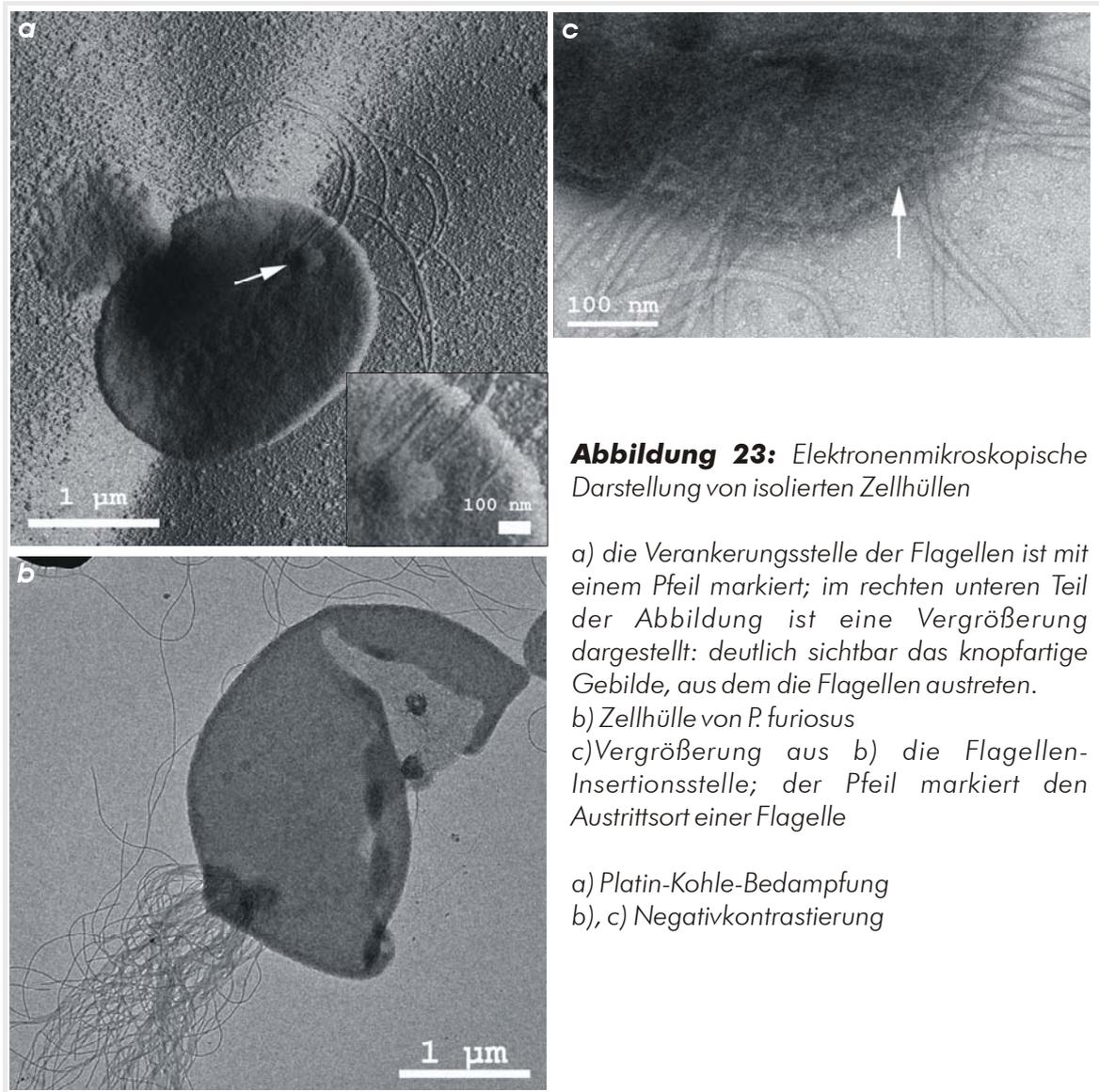


Abbildung 22: Elektronenmikroskopische Darstellung von *P. furiosus*-Zellen

a) Austrittsort der Flagellen, b) die Bündelung der Flagellen, jeweils mit Pfeilen markiert;
 c) ebenfalls am Zellpol austretende dünnere Filamente und d) vergrößerte Aufnahme der Filamente, jeweils mit Pfeilen markiert;
 e) Zell-Zell-Verbindung aus Flagellen, der Pfeil markiert den Austrittsort, f) vergrößerte Aufnahme der Insertionsstelle, das Ende der Umhüllung (dunklere Kontrastierung) ist mit einem Pfeil markiert.
 a), b) Platin/Kohle-Bedampfung
 c), d), e), f) Negativkontrastierung

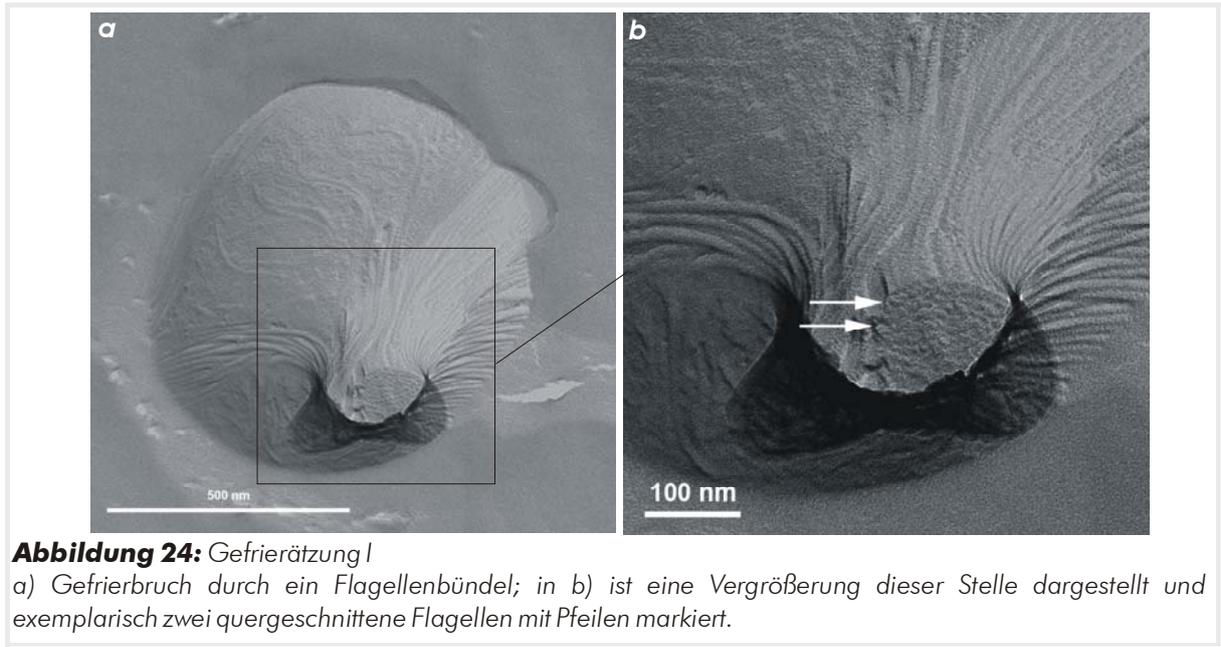
Häufig kommt es zu einer Bündelung des Flagellenbüschels, wobei dies am Zellpol oft durch eine Hülle geschieht. Es konnten sowohl große kompakte Bündel als auch mehrere kleinere Bündel nachgewiesen werden (Abb.22b). Derartige „Flagellenbündel“ können auch zu Verbindungen zwischen zwei Zellen führen (Abb.22e). Einzelne Flagellen konnten, auch innerhalb der wohlgeordneten Bündelung am Zellpol, mittels Uranylacetat kontrastiert werden (Abb.22f). Die Flagellen werden durch eine sie umgebende Schicht zusammen gehalten und als Bündel fixiert. Die Hülle liegt zumeist durchgehend über die gesamte Länge

der Zell-Zell-Verbindungen auf. Ohne diese Hülle weiten sich die Flagellen zu einem leichtem Büschel.

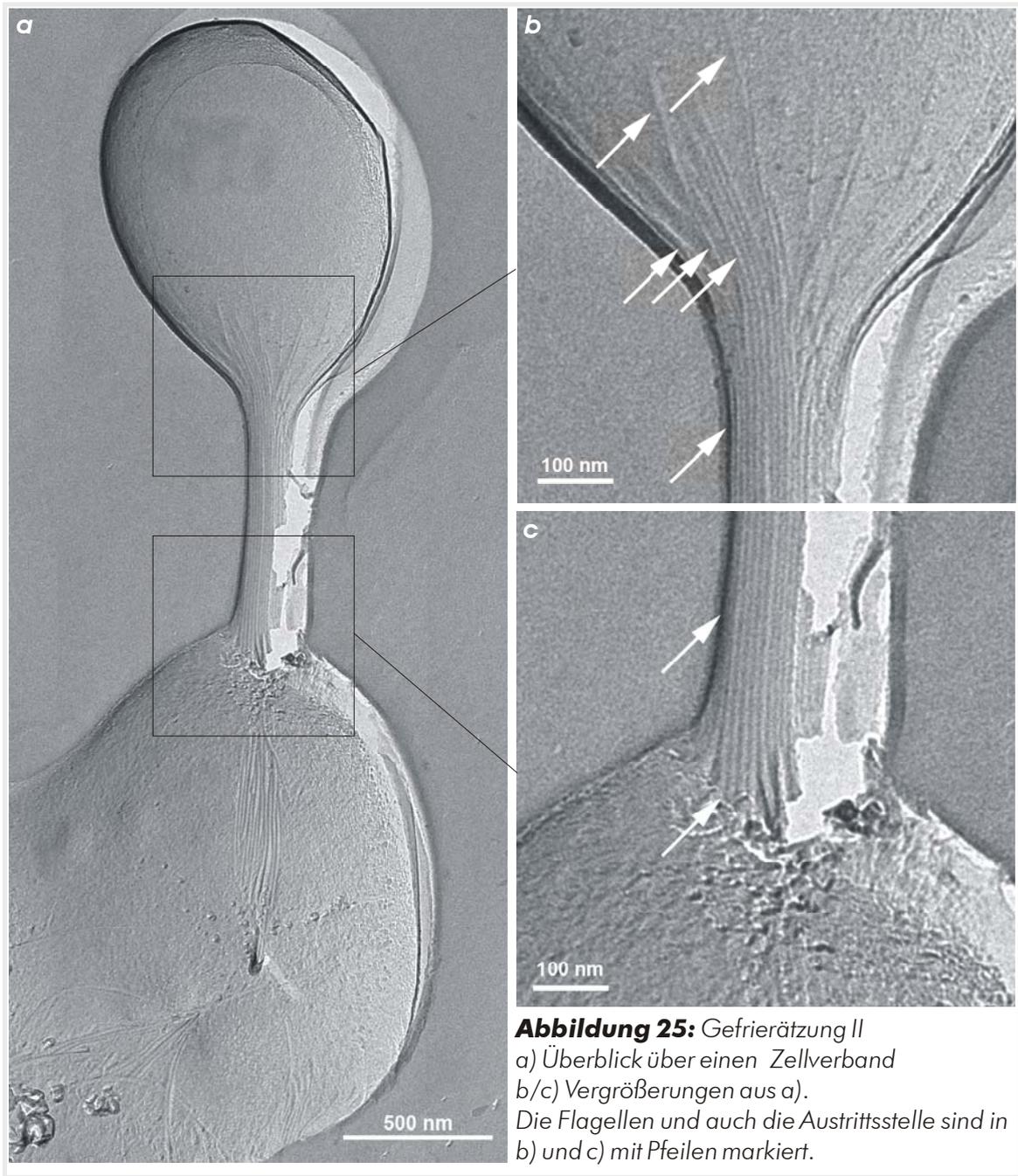


8.2.2 Gefrierätzung

Durch eine Gefrierätzung einer Zellkultur konnte dargestellt werden, dass es sich bei den Zell-Zell-Verbindungen tatsächlich um eine Struktur aus Flagellen handelt, die zum Teil durch eine nicht weiter klassifizierte Hülle umgeben werden. In einem Querbruch ist deutlich zu erkennen, dass sich das Bündel ausschließlich aus einzelnen Filamenten zusammensetzt, deren Zahl im Durchschnitt der üblichen Anzahl an vorhandenen Flagellen entspricht (Abb.24).

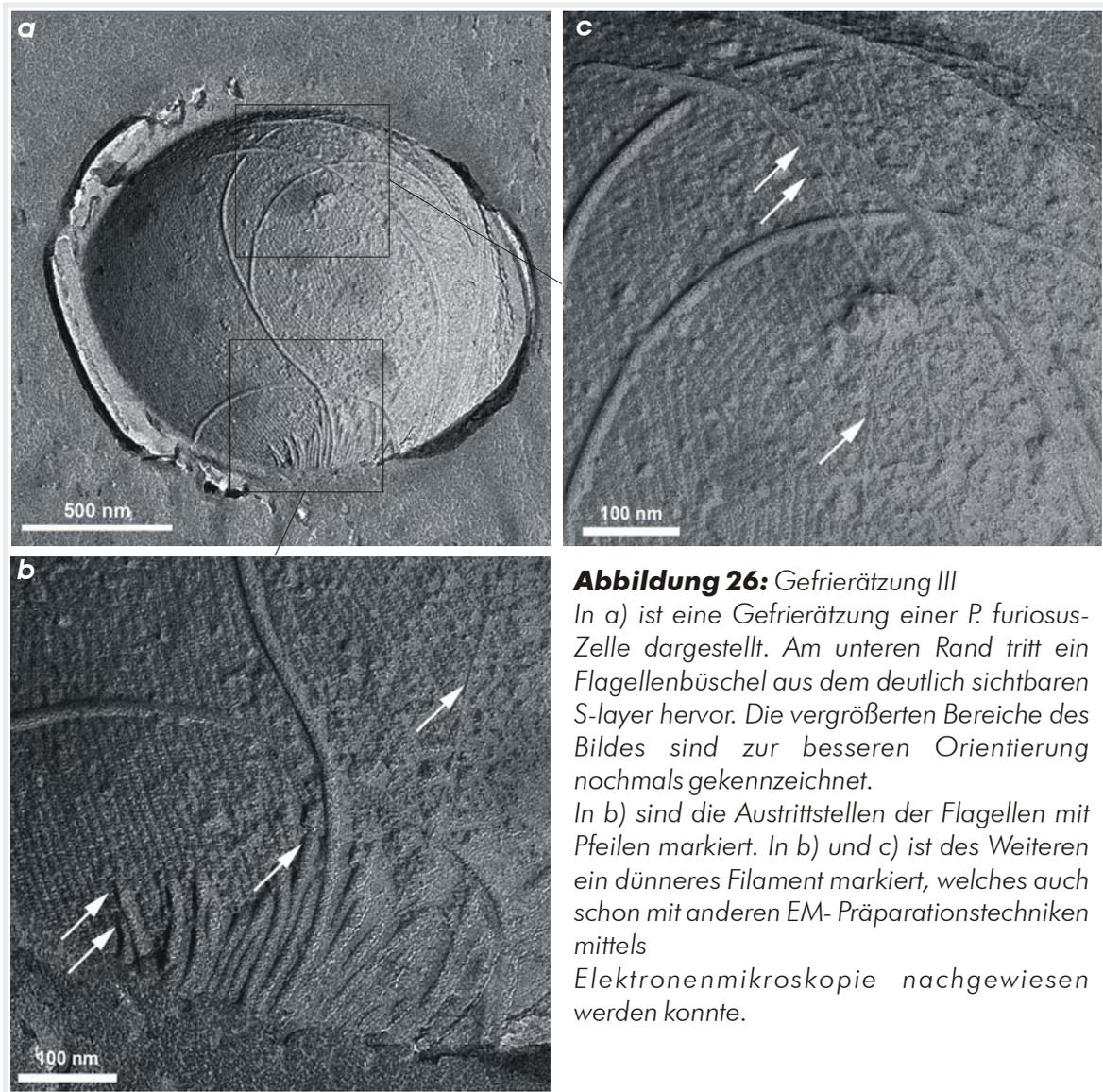


Diese Verbindung geht von einer Zelle aus und „dockt“ an einer zweiten Zelle an. Auch hier wird deutlich, dass es an der Austrittsstelle der Flagellen zur deutlichen Ausbuchtung des Zellpols kommt (Abb.25a). In Vergrößerungen ist ersichtlich, dass das Bündel aus einer breitgefächerten Basis von einer Zelle entspringt und geordnet in die zweite Zelle integriert (wird), wobei keine genaueren Ergebnisse über diese (Insertions)Stelle getroffen werden können (Abb.25b/c).



Durch die Gefrierbruchmethode wird zudem offensichtlich, dass *P. furiosus* einen S-layer besitzt, der aber unter einer weiteren Schicht, vermutlich dem nicht weiter klassifizierten Glycan, zu liegen kommen kann, weshalb die Darstellung nur sehr selten gelingt. In Abb.26 ist zu erkennen, dass die Flagellen mühelos durch die S-layer-Schicht dringen. Die Flagellen kommen bei dieser Präparationsmethode oft in dieser Schicht zu liegen, wobei dies wahrscheinlich unter normalen physiologischen Bedingungen nicht der Fall ist.

Auch mittels der Gefrierätzung konnte wie bereits durch negativ kontrastierte Präparate ein weiteres, sehr selten vorhandenes, dünnes Filament nachgewiesen werden (Abb.26b/c). Die Dicke dieses Filaments konnte an diesen Präparaten nur sehr ungenau geschätzt werden, da es sich um eine indirekte Abbildung der Objekte handelt. Deshalb wird auf die oben (III.A.8.2.1) genannten Messungen verwiesen.



8.2.3 Immunmarkierung

Eine Markierung mittels des anti-Fla Pfu-Antikörpers führt bei einer Verdünnung von 1:20000 zu einer zufriedenstellenden Markierung der isolierten Flagellen. Die detektierbaren Goldkörnchen sind dabei nicht vollständig über die Flagellen verteilt, sondern befinden sich gehäuft an verschiedenen Stellen (Abb.27). Dies kommt durch eine Mehrfachbindung des sekundären Antikörpers an das entsprechende Antigen zu Stande.



Es wurde mehrfach versucht, eine Immunmarkierung der Flagellen für die Elektronenmikroskopie von Zellen anzufertigen, die auf Gold-Trägernetzchen aufgewachsen waren (III.A.9.2). Nach der Versuchsdurchführung konnten bei der Mikroskopie der Trägernetzchen im Elektronenmikroskop keine Zellen, auch nicht in der Negativkontrolle, nachgewiesen werden (III.A.9.2.2).

Dieses Ergebnis zeigte sich auch, wenn die Zellen aus einer Flüssigkultur auf die Trägernetzchen aufgetragen wurden und anschließend dem Immunmarkierungsprotokoll unterzogen wurden.

Eine Immunmarkierung in Flüssigkeit und der nachträgliche Auftrag auf die Trägernetzchen führt im Vergleich zu den oben genannten Methoden zu einer erfolgreichen Markierung. Alle vorhandenen Antikörper, die sich gegen einen rekombinant exprimierten Proteinabschnitt der einzelnen Flagelline richteten, führten zu keiner Markierung. Lediglich die anti-Fla Pfu-Antikörper (gerichtet gegen die Gesamt-Flagellenpräparation) führen zu einer erfolgreichen Markierung.

In Abb.28 ist die Immunmarkierung abgebildet, die unter Verwendung der anti-Fla Pfu-Antikörper erzeugt wurde. Die Markierung, die anhand der elektronendichten Goldkörnchen erkennbar ist, wurde nur an den Flagellen nachgewiesen, nicht an den Zellen oder der Zelloberfläche selbst.

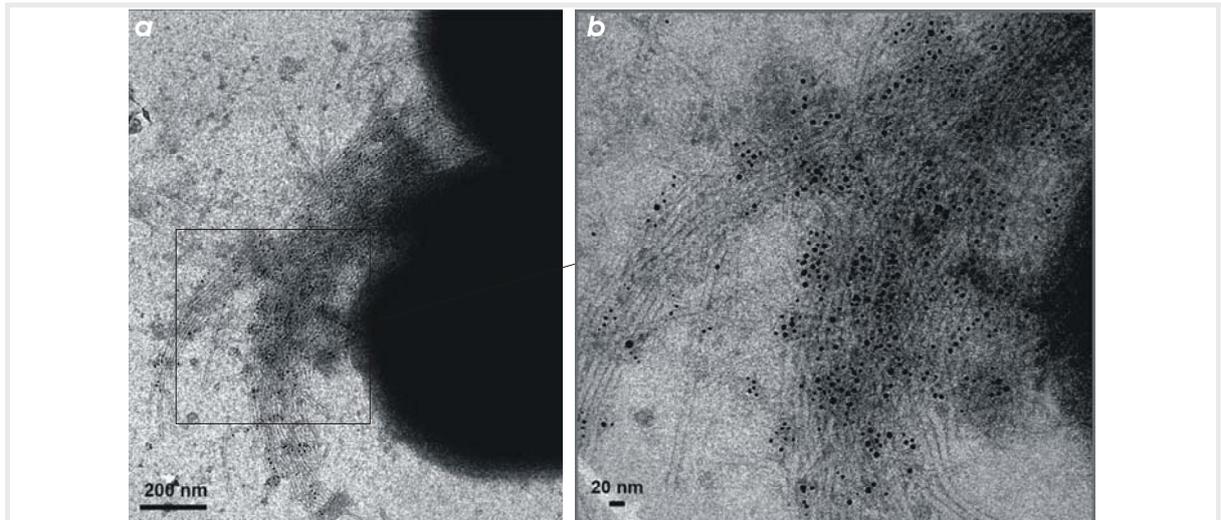


Abbildung 28: Immungoldmarkierung an *P. furiosus*-Zellen (Flüssigkultur)

a) Die Markierung der Flagellen ist durch die Goldkörnchen erkennbar; die Zellen wurden hingegen nicht markiert.

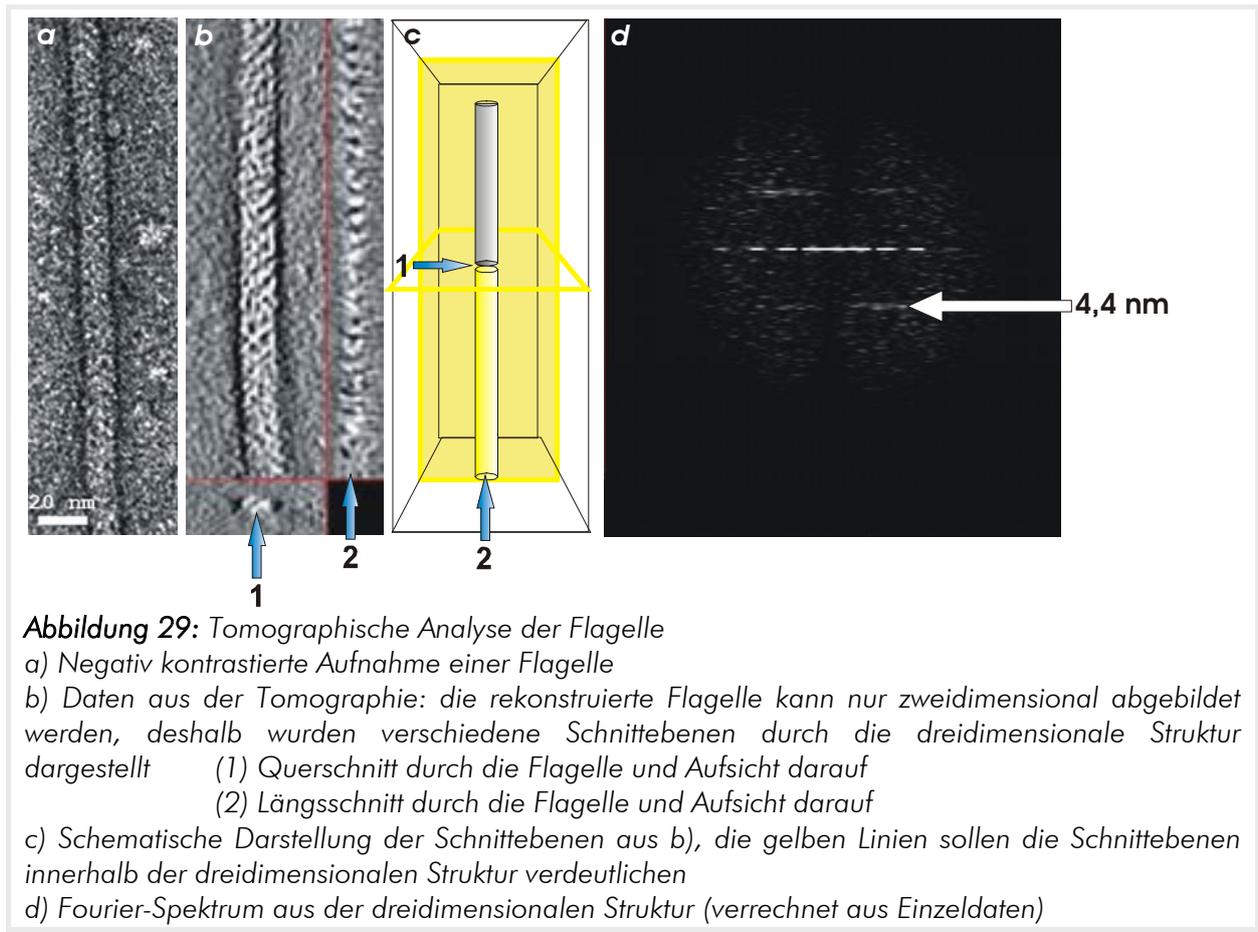
b) Vergrößerung aus a)

Zur Detektion wurde als primärer Antikörper anti-Fla Pfu in einer Verdünnung von 1:250 und als sekundärer Antikörper anti-rabbit 10 nm Gold in einer Verdünnung von 1:30 eingesetzt. Die Zellen wurden zusätzlich mit Uranylacetat negativ kontrastiert.

8.2.4 Tomographie

Zur Tomographie von Flagellen wurden diese standardmäßig 3 Stunden in einer SME-Lösung (pH 4) inkubiert, da in Vorversuchen (III.A.7.2) gezeigt werden konnte, dass die Flagellen unter diesen Bedingungen eine besonders augenfällige Strukturierung aufwiesen. Zur Probenaufbereitung wurden Trägernetzchen gewählt, die durch Rechteckfelder speziell für die Verkipfung des Präparates während der Mikroskopie geeignet waren. Zudem wurde für eine spätere Alignierung der einzelnen Aufnahmen kolloidales Gold mit einem Durchmesser von 6 nm aufgebracht.

Tomographie-Analysen einzelner Flagellen zeigen, dass es sich nicht um hohle Strukturen handelte (in Abb.29b/c mit 1 und 2 gekennzeichnet). Die Dicke der Flagelle beträgt 13 nm. Durch Fourier-Filterung einzelner Bilder konnte die helikale Periodizität (Wiederholungen identischer Struktureinheiten innerhalb einer Helix) auf 4,4 nm festgelegt werden. Aus den vorliegenden Daten konnte bislang nicht eindeutig geschlossen werden, ob es sich um eine zwei- oder dreisträngige Helix handelt.

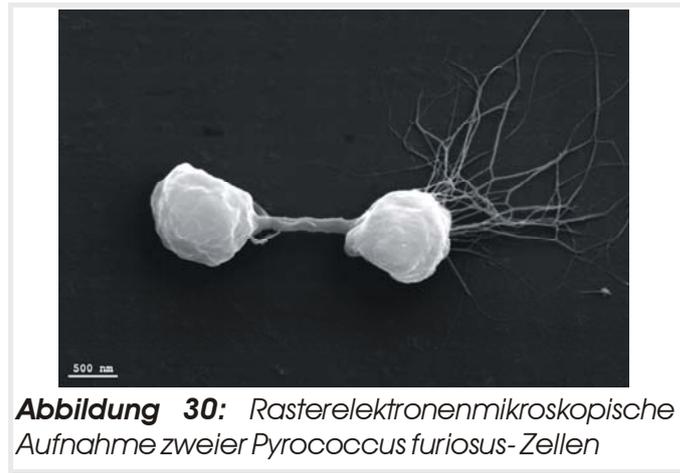


Für die Tomographie der Zellhüllen wurden ebenfalls die oben erwähnten Trägernetzchen verwendet, jedoch wurde zur späteren Alignierung kolloidales Gold mit einer Korngröße von 10 nm aufgebracht. Alle bisher durchgeführten Tomographieversuche von Zellhüllen erbrachten keine befriedigende Auflösung der Flagellen-Insertionsstelle, weshalb die Daten nicht aufgeführt sind.

8.3 Rasterelektronenmikroskopie

8.3.1 Gefrierbruch

Zur Analyse wurden Zellen aus der Flüssigkultur verwendet und mittels des Gefrierbruchprotokolls verarbeitet (es handelt sich also explizit *nicht* um Zellen, die auf einem Material aufgewachsen waren, dies wird in Kapitel III.A.9.2 weiterhin erläutert). In Abb.30 sind zwei *P. furiosus*-Zellen dargestellt, die durch eine Zell-Zell-Verbindung in Kontakt stehen. Vergleicht man die Aufnahmen mit den in Abb.25 dargestellten Gefrierätzungs-Aufnahmen, wird deutlich, dass die Zell-Zell-Verbindung von der linken Zelle ausgeht (wiederum ist eine deutliche Ausbuchtung der Zelle an dieser Stelle erkennbar) und in der rechts gelegenen Zelle inseriert. Die linke Zelle zeigt kein Flagellenbündel, was den Befund stützt, dass die Verbindung durch die Flagellen *einer* Zelle ausgebildet wird. Die rechte Zelle zeigt eindeutig ein gut ausgebildetes Flagellenbündel am entgegengesetzten Pol.



8.3.2 Immunmarkierung

Für Immunmarkierungen an Aufwuchspräparaten wurde mit *Pyrococcus furiosus* bewachsenes gesintertes Quarzmaterial bzw. Sandkörnchen gewählt (vgl. III.A.9.2.2.2). Außerdem wurde in jedem Experiment eine Negativkontrolle (ohne primären Antikörper) mitgeführt. Die Zelldichte auf den bewachsenen Präparaten war im Vergleich mit der Negativkontrolle nach der Versuchsdurchführung sehr gering. Dies war bereits in Immunmarkierungen für die Fluoreszenzmikroskopie und TEM gezeigt worden. Eine Darstellung im Rasterelektronenmikroskop erwies sich daher als schwierig. Wenn Zellen mikroskopiert werden konnten, lag die Markierung (sichtbar durch die Goldkörnchen) ausschließlich an den Flagellen vor (Daten nicht gezeigt).

Bei einer Immunmarkierung in Lösung und anschließender Präparation für die Rasterelektronenmikroskopie konnten die Antikörper-gebundenen Goldkörner trotz einer Größe von 10 nm nur sehr schlecht dargestellt werden (Daten nicht gezeigt).

9. Schwimmverhalten und Aufwuchsversuche

9.1 Schwimmverhalten im Temperaturgradient

P. furiosus zeigt bei Temperaturen zwischen 70°C und 103°C Wachstum. Eine aktive Bewegung bzw. Fortbewegung der Organismen sollte deshalb in dem genannten Temperaturbereich nachweisbar sein.

Anaerob mit Kultur befüllte und verschlossene Glaskapillaren wurden über Temperaturbereiche von 20°C bis 95°C im Thermomikroskop beobachtet, wobei die Temperatur aufgrund der Trägheit des Heizsystems jeweils alle 10 Minuten um 5°C erhöht wurde. Da sich die Zellen spätestens nach ca. einer halben Stunde vermehrt am Boden der Glaskapillare ablagerten, wurde für jede Temperaturstufe eine neue Kapillare befüllt und diese 5 Minuten bei der jeweiligen Temperatur äquilibriert.

Ab etwa 75°C wird eine sehr langsame Fortbewegung einzelner Zellen beobachtet. Aktive Bewegung muss hier deutlich von der bei höheren Temperaturen immer stärkeren Brownschen Molekularbewegung unterschieden werden.

Wurden unter Verwendung der gleichen Versuchsanordnung Zellen getestet, deren Flagellen zuvor abgeschert wurden, kann kein Schwimmverhalten beobachtet werden. Eine DAPI-Färbung sicherte ab, dass nicht nur defekte Zellhüllen beobachtet wurden. Die Flagellen dienen also eindeutig der Motilität. Die Lebensfähigkeit dieser Präparationen wurde bereits untersucht (Kapitel III.A.1.1). Die Problematik bei der Beobachtung dieser Zellen erweist sich mit Sicherheit in der geringen Menge an "vermehrungsfähigen" Zellen im Vergleich zur Gesamtzellmenge (1×10^5 Zellen/ml im Gegensatz zu 5×10^8 Zellen/ml). Zudem kommt der bereits oben beschriebene Effekt zu tragen, dass im Laufe der Zeit alle Zellen auf den Boden absinken und keinerlei Aktivität mehr zeigen.

Es konnte nachgewiesen werden, dass die Flagellen im Gegenzug auch der Festheftung an Oberflächen dienen (Filmsequenz nicht gezeigt). Die Zellkultur befand sich in einer Kapillare, die mit einer Pumpe verschaltet war. Die Flüssigkeit konnte so in die eine oder andere Richtung gepumpt werden. Die beobachtete, anheftende Zelle bewegt sich beim Pumpen in eine Richtung um 2 – 3 Zelllängen, beim Umschalten und Pumpen in die entgegengesetzte Richtung wiederum um 1 – 2 Zelllängen. Eine Anheftung mit dem Zellkörper konnte somit ausgeschlossen werden. Zellen in der Umgebung wurden durch die Strömung über größere Strecken bewegt. Da die durchschnittliche Länge des Flagellenbündels ca. 3,5 - 4 μm beträgt, ist diese Beobachtung vermutlich auf eine Anheftung der Flagellen an die Kapillarenoberfläche bzw. die Kapillareninnenfläche zurückzuführen.

9.2 Aufwuchsversuche

In einigen vorangestellten Versuchsteilen wurde bereits die Fähigkeit von *P. furiosus* dargestellt, sich an Oberflächen anzuheften. Dies warf die Frage auf, ob es sich dabei um eine aktive Festsetzung beziehungsweise Besiedlung handelt. Zudem war zu klären, ob derart anhaftende Zellen zu einer Zellteilung befähigt waren. Die Daten aus der Analyse des Schwimmverhaltens gaben insoweit darüber Aufschluss, dass ein Kontakt mit Oberflächen stattfindet und dieser wahrscheinlich durch die Flagellen vermittelt wird. Im Folgenden sind verschiedene Versuchsansätze sowohl für die Fluoreszenzmikroskopie, als auch für die Raster- und Transmissions-Elektronenmikroskopie dargestellt.

9.2.1 Fluoreszenzmikroskopische Analysen

Es wurde das Wachstum von *P. furiosus* auf natürlich vorkommenden Materialien untersucht. In Hinblick auf spätere, industrielle Anwendungen wurden aber zudem auch "künstliche" Materialien untersucht. Alle Materialien wurden (fluoreszenz)mikroskopisch kontrolliert. Hierzu wurden zur Dokumentation jeweils, falls möglich, Durchlichtaufnahmen und zur Kontrolle zusätzlich Fluoreszenzaufnahmen (Anfärbung der Zell-DNA mittels DAPI) vorgenommen. Tabelle 18 gibt einen Überblick über das Aufwuchsverhalten von *P. furiosus* auf den verschiedenen Materialien wieder.

Getestetes Material	Resultat – Bewertung des Wachstums⁹
Kupfer (Trägernetzchen)	+++
Kupfer (Trägernetzchen, mit Kohlefolie befilmt)	+++
Nickel (Trägernetzchen)	+++
Nickel (Trägernetzchen, mit Kohlefolie befilmt)	+++
PC	+++
Plexiglas	+++
Wafer	++
Aluminiumfolie	+
Emaile	+
Holz	+
PVC	+
Glimmer	(+)
PTFE	(+)
Stahl	(+)
Cellophan	-
Glas	-
Styropor	-
Nylon	?
PE	?

Tabelle 20: Aufwuchsverhalten auf verschiedenen Oberflächen

Die dargestellten Ergebnisse beziehen sich auf die Auswertung mittels Fluoreszenzmikroskopie

P. furiosus zeigte sehr positives Wachstum auf teils natürlich vorkommenden Materialien, aber auch auf industriell erzeugten Materialien. Da sich auf einigen der getesteten Oberflächen schlechteres oder gar kein Wachstum nachweisen ließ, kann ausgeschlossen werden, dass es sich um einen unspezifischen Effekt handelt. In Abb.31 sind einige der getesteten Materialien dargestellt, wobei nur die Aufnahmen gezeigt sind, die mittels DAPI-Färbung erstellt wurden. Da die verwendeten Materialien zumeist eine kompakte, lichtundurchlässige Strukturierung besaßen, wurde insgesamt zu einer vergleichenden Dokumentation auf die Fluoreszenzmikroskopie zurückgegriffen. PE und Nylon konnten nicht ausgewertet werden, da sie eine starke Eigenfluoreszenz besitzen.

⁹ Bewertungen: +++ starkes Wachstum; Material vollständig bewachsen (flächig oder Kolonien) pro getestetem Material (10 x 10 x 1 mm)
 ++ mäßiges Wachstum; viele Kolonien pro getestetem Material (10 x 10 x 1 mm)
 + geringes Wachstum; ein – drei Kolonien pro getestetem Material (10 x 10 x 1 mm)
 (+) einzelne Zellen oder kleine Kolonien pro getestetem Material (10 x 10 x 1 mm)
 - kein Wachstum

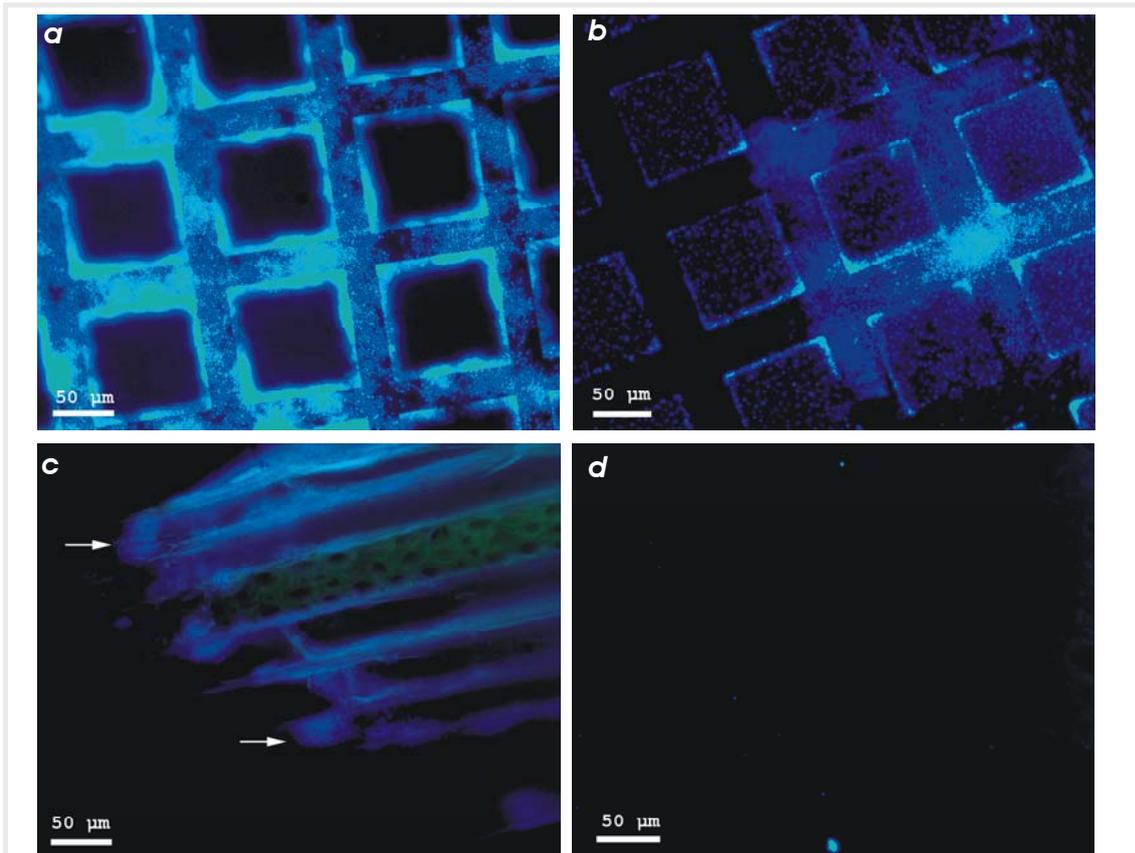


Abbildung 31: Aufwuchsversuche auf verschiedenen Materialien

Nachweis der Zellen mittels DAPI-Färbung

In a) sind *P. furiosus*-Kolonien dargestellt, die auf einem Gold-Trägernetzchen ohne Kohlefolie aufgewachsen waren; viele Zellen und Kolonien konnten auf den Stegen und auch am Rand nachgewiesen werden. b) *P. furiosus* kann auch auf der aufgebrauchten Kohlefolie (auf einem Nickelnetzchen) wachsen. Wachstum findet auch hier wieder zusätzlich auf den Stegen (ohne Kohlefolie, da es sich um die Rückseite des Netzchens handelt) statt. In c) ist mit der Holzoberfläche ein Material gezeigt, das von *P. furiosus* für das Oberflächenwachstum eher weniger bevorzugt wird (die Pfeile deuten auf zwei Kolonien, die sich zwischen den Leitbündelfasern befinden) und in d) wurde Glas als Mediumszusatz benutzt; es konnten keine Zellen nachgewiesen werden, die aufgewachsen waren.

9.2.2 Elektronenmikroskopische Analyse

9.2.2.1 Transmissionselektronenmikroskop

Vergleichend zur Fluoreszenzmikroskopie wurden die (mit Kohlefolie befilmten) Trägernetzchen aus den Aufwuchsversuchen auch elektronenmikroskopisch untersucht.

Es zeigte sich, wie bereits lichtmikroskopisch dargestellt, ein überaus dichter Bewuchs der Trägernetzchen (Tabelle 21).

Getestetes Material	Resultat – Bewertung des Wachstums ⁹
Kupfer (Trägernetzchen, mit Kohlefolie befilmte)	+++
Nickel (Trägernetzchen, mit Kohlefolie befilmte)	+++

Tabelle 21: Aufwuchsverhalten auf Trägernetzchen für die Elektronenmikroskopie



In einer Übersichtsaufnahme eines Trägernetzchen (Abb.32a) wird deutlich, dass es sich um eine aktive Festheftung der Zellen handeln muss. Vergleicht man diese mit herkömmlich präparierten Zellen (Abb.32c), die auf Trägernetzchen aufgetragen wurden, weisen diese eine deutlich höhere Zelldichte auf. Die Verteilung der Zellen stellt sich nicht gleichmäßig dar, sondern zeigt Bereiche in denen kolonieartig viele, unter anderem auch in Teilung befindliche Zellen gefunden werden können (Abb.32a/b). Die Zellen weisen insgesamt eine geringere Schädigung auf, als Zellen, die mit der Standardtechnik präpariert wurden. Zellen, die auf den Trägernetzchen aufgewachsen waren, zeigen im Vergleich zu den Zellen, die durch die herkömmliche Präparation aufgebracht wurden, mehr Zell-Zell-Verbindungen und auch mehr Flagellen (Abb.32d).

Es wird deutlich, dass hier also zum Einen aktive Festheftung, zum Anderen aber auch anschließende bzw. zusätzliche Zellteilung vorliegt, was zu einer Biofilmbildung führt. Die verwendete Präparationsmethode weist für die Untersuchungen von Zellanhängen einen klaren Vorteil auf.

9.2.2.2 Rasterelektronenmikroskop

Im Rasterelektronenmikroskop wurden vorzugsweise Materialien getestet, die zum Einen sehr starken Bewuchs aufwiesen (vgl. Tabellen 20/21) oder aber weder mit dem Durchlichtmikroskop oder dem Transmissionselektronenmikroskop analysiert werden konnten.

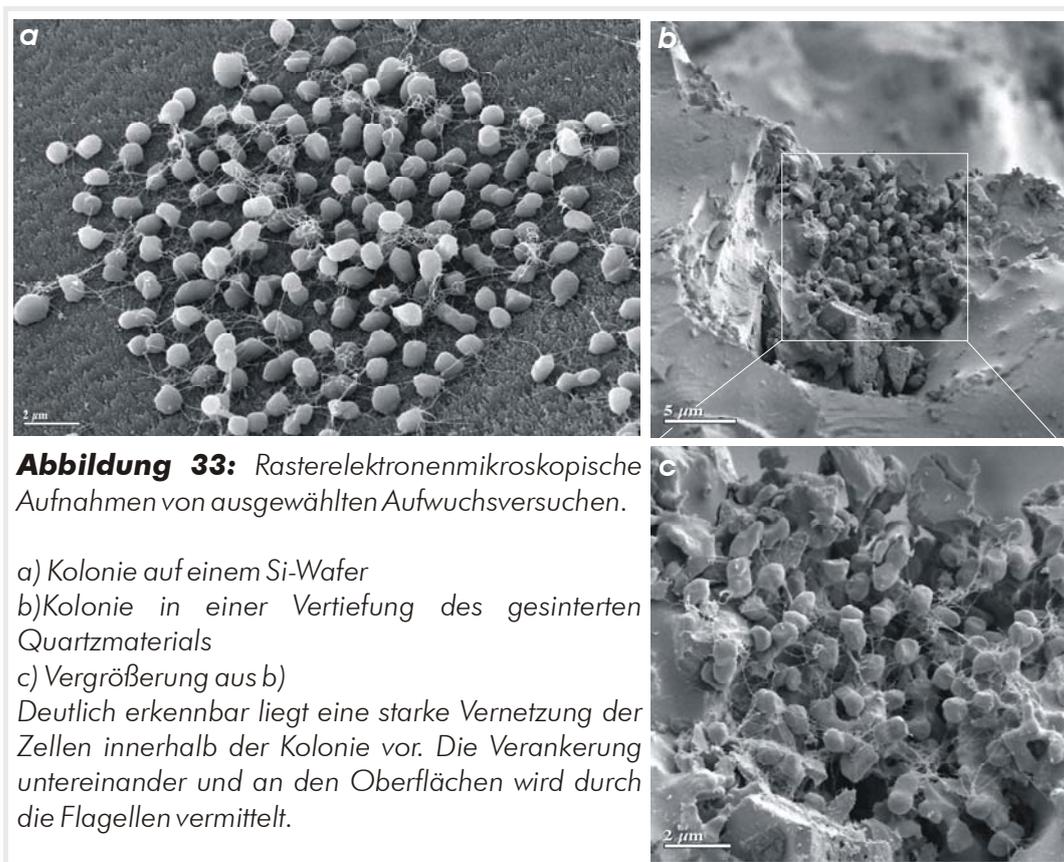
Tabelle 22 enthält eine Zusammenstellung der untersuchten Proben und eine Bewertung des beobachteten Aufwuchsverhaltens. Abb.33 zeigt eine Auswahl entsprechender rasterelektronenmikroskopischer Aufnahmen.

<i>Getestetes Material</i>	<i>Resultat – Bewertung des Wachstums⁹</i>
Sand vom Original-Isolierungsort	+++
Gesintertes Quarz	+++
PC (Filtermaterial)	+++
Nylon	+++
Wafer	++
PVC	+
Glimmer	(+)
Stahl	(+)
Glas	-

Tabelle 22: Aufwuchsverhalten auf verschiedenen Oberflächen

Bevorzugt wurden Materialien mittels Rasterelektronenmikroskopie getestet, die entweder im Fluoreszenzmikroskop eine Eigenfluoreszenz aufwiesen oder Materialien, die aufgrund ihrer geringen Größe (z.B. Sand) im Elektronenmikroskop betrachtet werden mussten.

Einige Ergebnisse aus vorherigen Versuchen konnten, wie z.B. für Stahl, Glimmer, Glas und PVC bestätigt werden. Auf Nylon und PC konnte ein sehr starkes Wachstum nachgewiesen werden.

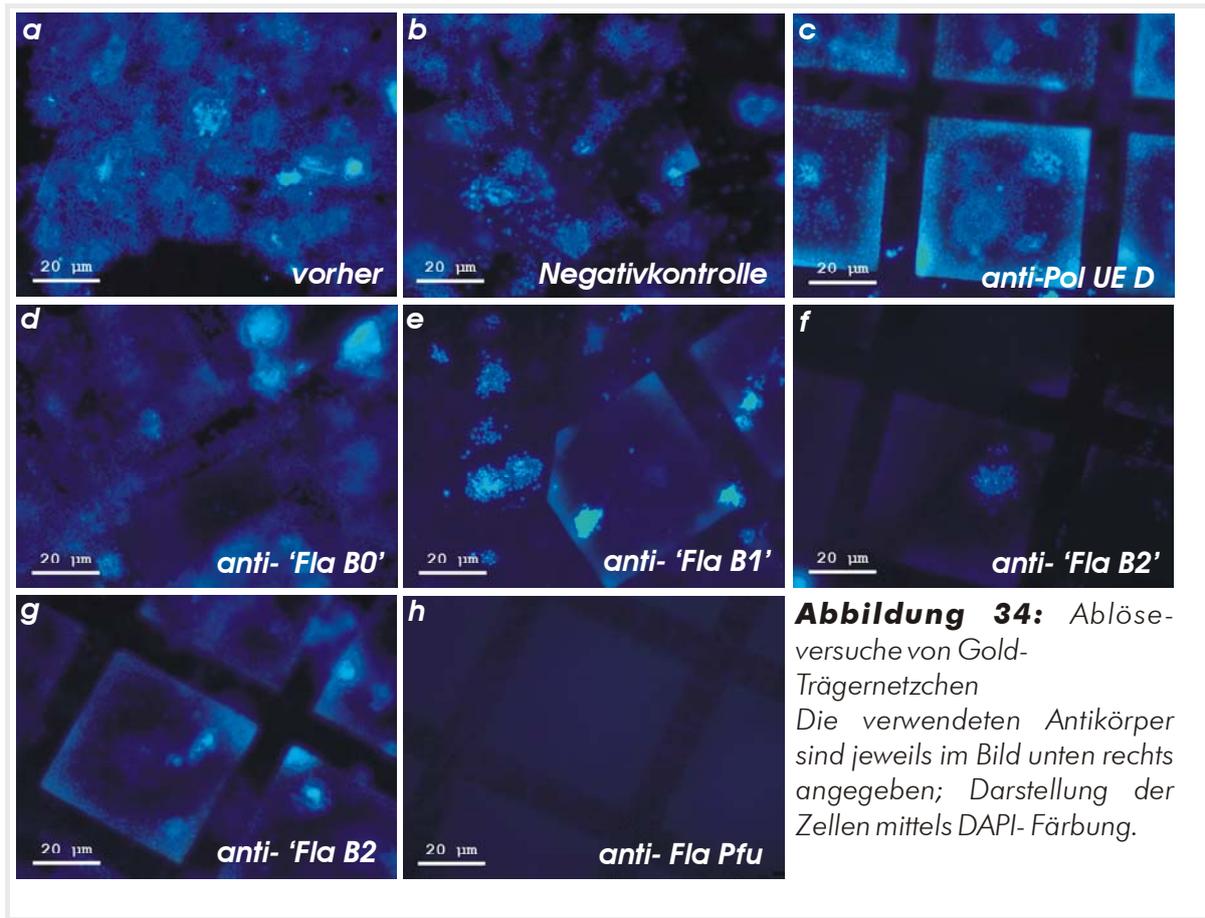


9.2.3 Immunologische Versuchsvarianten – Ablösen aufgewachsener Zellen mit Antikörpern

Aus den bisher gewonnenen Daten wurde impliziert, dass die Festsetzung der Zellen auf Oberflächen durch die Flagellen vermittelt wird. Es lag deshalb nahe zu testen, ob diese Anheftung durch eine Zugabe von Antikörpern gelöst werden kann. Die Verwendung der Flagellen-spezifischen Antikörper (gerichtet gegen die rekombinant erzeugten Proteinabschnitte) könnte zudem zeigen, ob ein einziges, bestimmtes Flagellinprotein für die Anheftung verantwortlich ist. Eine *Verhinderung* der Festsetzung der Zellen durch die Zugabe von Antikörpern während der Anzucht war aufgrund der hohen Inkubationstemperaturen nicht möglich. Die Tests wurden deshalb als Abwandlung einer Immunmarkierung durchgeführt.

9.2.3.1 Fluoreszenzmikroskop

Für die Tests wurden Aufwuchsversuche auf befilmten Trägernetzchen (und Polycarbonat-Blöckchen) durchgeführt. Jedes Trägernetzchen wurde vor den Versuchen auf Bewuchs kontrolliert. Da es durch die Versuchsdurchführung selbst zu mechanischen Schädigungen der Kolonien auf den Trägernetzchen kommen könnte und diese dadurch abgelöst werden könnten, wurden die Daten nicht mit dem ursprünglichen, unbehandelten Zustand verglichen. Alle Ergebnisse wurden in Bezug gesetzt zu einer Negativkontrolle, die lediglich ohne primären Antikörper angefertigt wurde. Zudem wurde eine weitere Kontrolle mitgeführt, wobei sich der verwendete Antikörper gegen die Polymerase Untereinheit D von *P. furiosus* gerichtet war. In diesen beiden Ansätzen sollte es praktisch zu keiner Ablösung kommen.



Alle verwendeten Trägernetzchen waren vor Versuchsbeginn gleich stark bewachsen. Bei den beiden als Negativkontrollen geführten Trägernetzchen wird eine geringe Ablösung im Vergleich zu den unbehandelten Trägernetzchen deutlich (Abb.34a/b/c). Eine Inkubation des bewachsenen Netzchens mit den gegen Gesamtflagellen gerichteten anti-Fla Pfu-Antikörpers führt zur nahezu vollständigen Ablösung aller Zellen (Abb.34h). In Relation dazu wird jedoch deutlich, dass aus der Gesamtheit der getesteten Antikörper, die gegen rekombinante Proteinabschnitte gerichtet waren, anti-'FlaB2' zur vergleichsweise stärksten Ablösung der Zellen führt. Ein ähnliches, etwas schwächeres Ablöseverhalten ergibt sich unter Verwendung der anti-'FlaB1'- und anti-'FlaB2'-Antikörper. Die vergleichsweise schwächste Ablösung wird mit anti-'FlaB0' beobachtet.

In weiteren Versuchsreihen waren die Zellen unter Zusatz von Polycarbonat-Blöckchen zum Medium inkubiert worden. Mit den darauf aufgewachsenen Zellen wurden die oben beschriebenen Tests durchgeführt. Die bereits erhaltenen Ergebnisse konnten bestätigt werden.

9.2.3.2 Elektronenmikroskopie

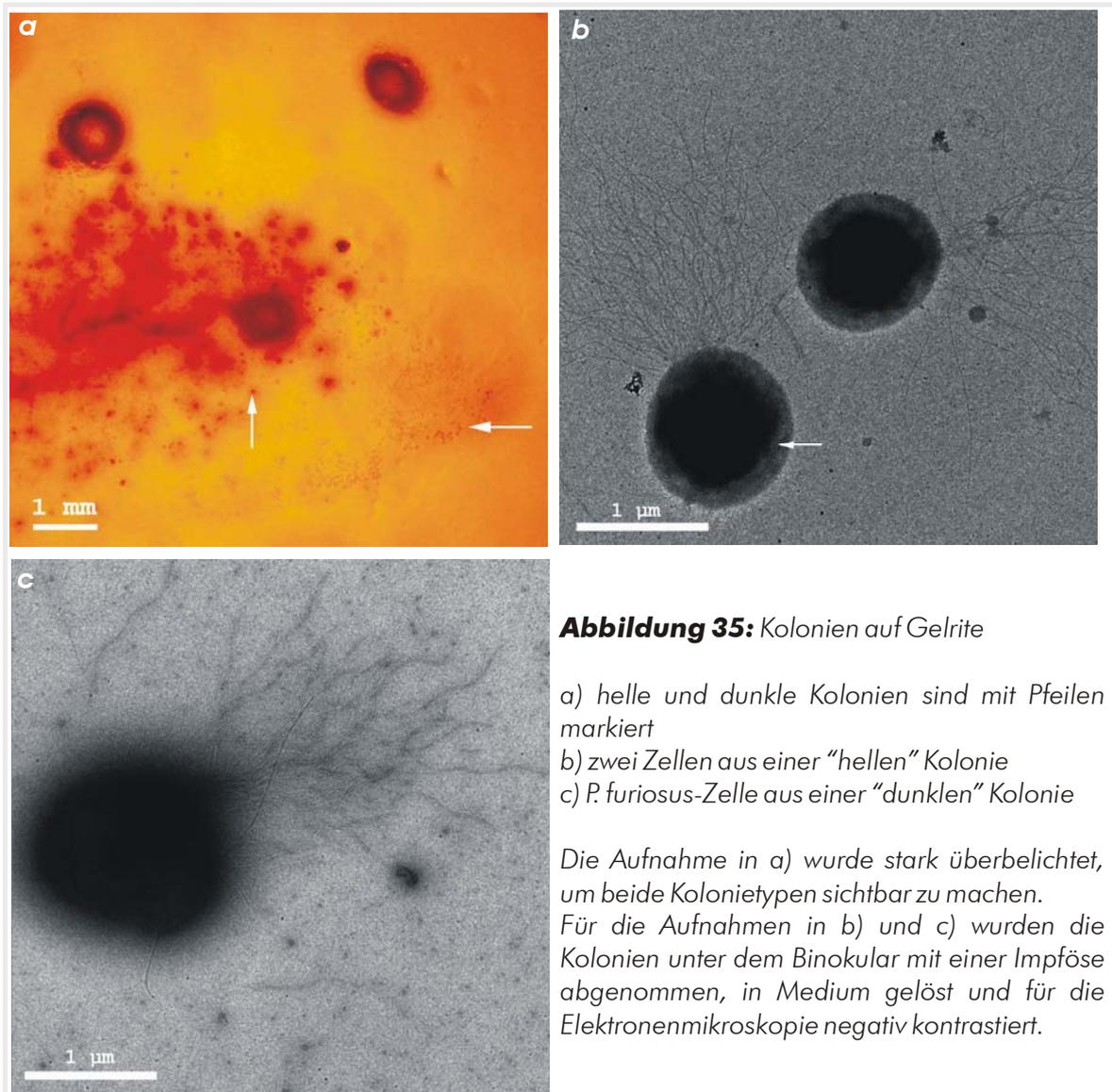
Versuche, die bereits für die Fluoreszenzmikroskopie durchgeführten Ablöseversuche im Transmissionselektronenmikroskop darzustellen, verliefen ohne Erfolg. Wie bereits unter III.A.8.3.2 gezeigt werden konnte, befinden sich auf keinem der Trägernetzchen nach dem

Versuchsablauf noch Zellen. Auch die Negativkontrollen wiesen keine Zellen mehr auf, weshalb die Versuche für die Elektronenmikroskopie nicht ausgewertet werden konnten.

Im Fall der Rasterelektronenmikroskopie wurde bereits dargestellt, dass eine Immunmarkierung an aufgewachsenen Zellen (in diesen Fällen auf Sandkörnern und gesinterten Quarzmaterial) ebenfalls zu einer fast vollständigen Ablösung der Zellen führte. In diesen Fällen wiesen die Negativkontrollen (also unter Verwendung des anti-Pol UE D-Antikörpers bzw. keines Antikörpers) eine normale Zelldichte auf.

9.2.4 Gelriteplatten

Es sollte getestet werden, ob *P. furiosus* auch auf „festen“ Nährmedien angezogen werden kann. Nach Inkubation über 48 h bei 85°C zeigten sich verschiedene Formen von Kolonien, deren Durchmesser durchschnittlich 0,05 – 0,1 mm betrug. Kolonien, die auf der Oberfläche der Platten wuchsen, zeigten eine helle bis fast durchsichtige Morphologie. Waren die Zellen durch das Ausplattieren mittels der Impföse zufällig unter die Gelrite-Oberfläche unterhoben worden, zeigten die Kolonien eine bräunliche bis dunkelrötliche Färbung. Eine lichtmikroskopische Kontrolle der mittels sterilem Zahnstocher getrennt abgenommenen Zellen ergab keinerlei Unterschiede. Eine fluoreszenzmikroskopische Kontrolle der Zellen (Färbung mit Calcofluor) ergab eine starke Färbung der Zellen aus den weißlichen, „oberflächlich“ gewachsenen Kolonien. Da Calcofluor zur Anfärbung von Glycanen dient, kann angenommen werden, dass die mit bloßem Auge wahrnehmbare hellere Färbung der Kolonien auf den Gelrite-Platten auf eine auf den Zellen aufgelagerte Glycanschicht zurückzuführen ist. Eine Untersuchung dieser Zellen im TEM bestätigte, dass die helleren, auf der Oberfläche gewachsenen Zellen, eine sehr dicke (Glycan)Schicht aufwiesen (Abb.35b). Die in die Gelriteschicht eingearbeiteten Zellen zeigten eine dünne bzw. keine (Glycan)Schicht (Abb.35c). Für die Anzahl der Flagellen ergaben sich hingegen keine Unterschiede zwischen den beobachteten Kolonieförmungen.



B) Nachweis spezifischer Transkripte des *fla*-Genclusters

Die Zellanhänge von *P. furiosus* sollten nicht nur physiologisch und strukturell, sondern auch auf genetischer Ebene untersucht werden. Zunächst einmal war hierbei das Vorkommen und die Anordnung der verschiedenen Gene von Interesse, die für den Aufbau einer komplexen Struktur wie der Flagelle verantwortlich sind. Da sich bei der Untersuchung der Proteine einige Unregelmäßigkeiten ergeben hatten (wie u.a. unter III.A.4 geschildert) wurden Teile des als Operon postulierten Genbereiches nachsequenziert. Die Spekulation über ein Operon liegt nahe, da wie in Abb.36 ersichtlich ist, alle Gene sehr eng zusammen in einem Cluster liegen. Ihnen wird im Datenbank-Vergleich mit Flagellen-Genen und Flagellen-assoziierten Genen anderer Archaeen entsprechende Funktionen für den Aufbau der Flagelle voraus gesagt. Zudem weisen alle Gene die gleiche Transkriptionsrichtung auf. Eine ähnliche Anordnung einiger Flagellen-Gene innerhalb eines Operons war bereits für *H.*

salinarum gezeigt worden (Patenge *et al.*, 2001). Zunächst soll noch einmal darauf eingegangen werden, welcher Bereich des Genoms untersucht wurde und wie sich dieser vor allem nach der unter III.A.4.2 bereits beschriebenen Nachsequenzierung darstellt.

1. Das *fla*-Gencluster

Unter III.A.4 wurde gezeigt, dass es mehr Flagelline gibt, als bisher angenommen wurde. Es stellte sich zudem die Frage, ob die in einem Cluster angeordneten Gene gemeinsam transkribiert werden und somit in einem Operon angeordnet vorliegen könnten. Ein Operon definiert sich in der Bakteriengenetik traditionell durch gemeinsame bzw. koordiniert exprimierte Gene. Der hier untersuchte Bereich wird im Genom (Gesamtgröße 1,9 Mbp) auf dem reversen komplementären Strang innerhalb der Positionen 344142 bis 353759 kodiert. Betrachtet man den gesamten Bereich des potentiellen Operons, so zeigt sich, dass die Gene sehr eng beieinander liegen, was eine Kotranskription der Gene ermöglichen würde. Des Weiteren werden die als *fla*-Gene identifizierten Gene von weiteren Genen flankiert, deren Funktion bislang nur durch Blast-Vergleiche vermutet werden kann oder nicht bekannt ist (stromaufwärts: PF0340/*hth* = Protein mit einem *hth*-Motiv (helix-turn-helix motif) und PF0339/*met* = potentielle Methyltransferase; stromabwärts: PF0329 (keine Funktionen vorgegeben)).

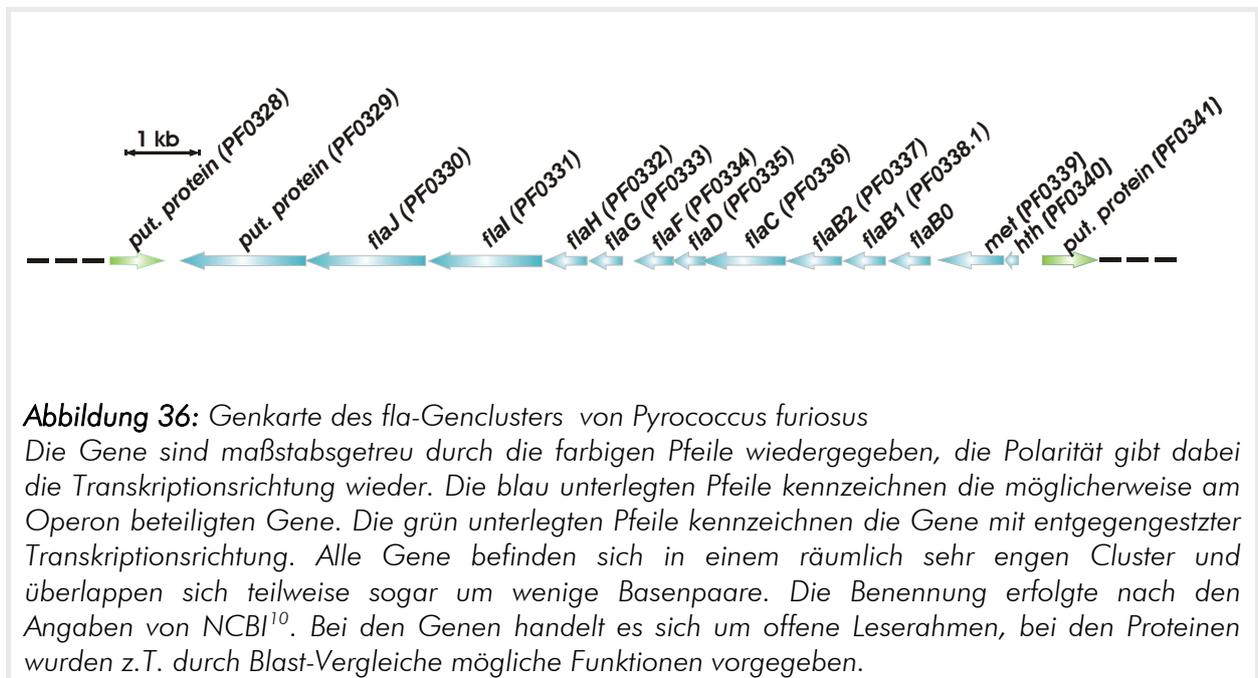


Abbildung 36: Genkarte des *fla*-Genclusters von *Pyrococcus furiosus*

Die Gene sind maßstabsgetreu durch die farbigen Pfeile wiedergegeben, die Polarität gibt dabei die Transkriptionsrichtung wieder. Die blau unterlegten Pfeile kennzeichnen die möglicherweise am Operon beteiligten Gene. Die grün unterlegten Pfeile kennzeichnen die Gene mit entgegengesetzter Transkriptionsrichtung. Alle Gene befinden sich in einem räumlich sehr engen Cluster und überlappen sich teilweise sogar um wenige Basenpaare. Die Benennung erfolgte nach den Angaben von NCBI¹⁰. Bei den Genen handelt es sich um offene Leserahmen, bei den Proteinen wurden z.T. durch Blast-Vergleiche mögliche Funktionen vorgegeben.

¹⁰ Zur Erklärung der Abkürzungen:

flaX gibt die Bezeichnung des Gens wieder; die Benennung erfolgt fortlaufend, da die Gene nacheinander angeordnet sind. Zudem erfolgte dies in Analogie zu den bereits bekannten *fla*-Genen anderer Archaeen. Bei allen Genen handelt es sich um offene Leserahmen.

PF0XXX gibt die Bezeichnung des Proteins wieder. In den meisten Fällen orientiert sich die Namensgebung an Blastanalysen mit bereits bekannten Proteinen. Für *flaB0* und *flaB1* wurden keine Bezeichnungen angegeben, da diese ja neu zugefügt bzw. ergänzt wurden und noch keine offiziellen NCBI-Kennnummern besitzen.

In der folgenden Tabelle 19 sind zur besseren Orientierung alle untersuchten Gene des potentiellen Operons, deren Lokalisation im Genom, die Genbezeichnungen und die möglichen Funktion der Proteine dargestellt.

Genkürzel	Genkennnummern nach NCBI	Lokalisation im Genom	(mögliche) Funktion
<i>hth</i> (helix-turn-helix motif)	PF0340	353433 – 353759	Regulation der Transkription
<i>met</i> (Methyltransferase)	PF0339	352470 – 353420	Methylierungen
<i>flaB0</i>		352384.70 – 352384.708	Strukturflagellin der Flagelle
<i>flaB1</i>	[PF0338]	351748 – 352384.8	
<i>flaB2</i>	PF0337	350944 – 351738	
<i>flaC</i>	PF0336	350457 – 350933	akzessorisches Protein des Flagellenapparates
<i>flaD</i>	PF0335	349245 – 350453	
<i>flaF</i>	PF0334	348707 – 349264	
<i>flaG</i>	PF0333	348225 – 348707	
<i>flaH</i>	PF0332	347500 – 348114	bindet wahrscheinlich den Komplex aus FlaI/J
<i>flaI</i>	PF0331	345866 – 347479	ATPase
<i>flaJ</i>	PF0330	344148 – 345854	Membranprotein; bindet wahrscheinlich FlaI
?	PF0329	342178 – 344142	Keine Angaben

Tabelle 23: Gen-/Protein-Bezeichnungen im Operon und deren mögliche Funktionen

2. Analyse des wachstumsabhängigen Expressionspools des *fla*-Genclusters

2.1 Nachweis mittels RT-PCR

Für das *fla*-Gencluster sollte eine mögliche Kotranskription von *fla*-Genen untersucht werden. Hierzu wurde die Gesamt-RNA in cDNA umgeschrieben und auf diese auf mögliche "Kotranskripte" überprüft. Alle Primerkombinationen mussten in den Positivkontrollen (unter Verwendung von genomischer DNA als template) eine positive Amplifikation aufweisen. Der mRNA-Pool, bzw. der cDNA-Pool konnte somit mit dem jeweils gleichen Testansatz wie im Fall der Positivkontrolle auf Amplifikate (=ursprünglich vorliegende Kotranskripte) hin untersucht werden. Die erhaltenen Ergebnisse wurden in Abb.37 zusammengefasst. Für eine eindeutige Aussage über die *möglichen* Kotranskripte wurden mehrere Versuchsreihen ausgewertet und deren Ergebnisse wiederum zusammengefasst. Einzelne Transkriptnachweise können im Anhang unter VIII.4 eingesehen werden.

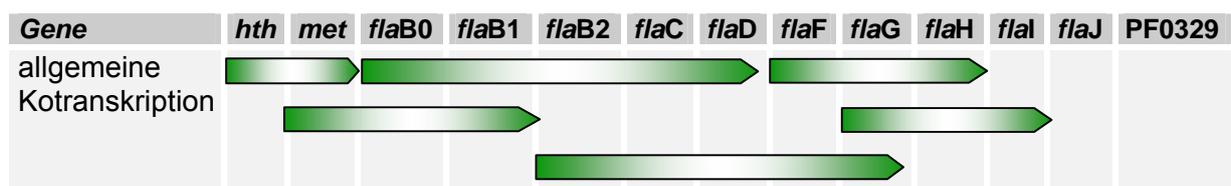


Abbildung 37: Innerhalb des *fla*-Operons nachgewiesene Kotranskripte

Die Genabfolge ist zur besseren Orientierung invertiert dargestellt. Einzeltranskripte (z.B. *flaJ*) sind hier nicht dargestellt.

In Abb.37 sind nur die gefundenen *Kotranskripte* dargestellt. Alle Gene ließen sich natürlich auch als Einzel-Genprodukte nachweisen. Die vereinfachte Darstellung der Ergebnisse zeigt deutlich, dass es zu einer Kotranskription mehrerer Gene kommt. Überraschend ist hierbei sicherlich die gemeinsame Transkription von *flaB0* und *met*. Das Gen *met* wird wiederum mit *hth* gemeinsam abgelesen. Die meisten Kotranskripte überschneiden sich. Weder für *flaJ* oder PF0329 konnte eine gemeinsame Transkription mit anderen, benachbarten Genen gefunden werden.

Analysen in Kombination mit den stromaufwärts bzw. stromabwärts liegenden Genen ergaben für PF0329 und PF0240 (*met*) keine Kotranskription mit den jeweils benachbarten Genen PF0328 bzw. PF0341.

Der Nachweis einer Kotranskription innerhalb und übergreifend über das *fla*-Gencluster hinaus wirft nun weitere Fragen auf. Können an verschiedenen Punkten der Wachstumskurve unterschiedliche (Ko)Transkripte gefunden werden? Gibt es (Ko)Transkripte, die nicht zu allen Zeitpunkten transkribiert werden?

Für verschiedene Stadien der Wachstumskurve (früh (1×10^7 Zellen/ml) und spät (4×10^7 Zellen/ml) exponentiell und spät stationär (1×10^8 Zellen/ml) wurde deshalb jeweils mRNA isoliert. Diese wurde in cDNA umgeschrieben und daraufhin auf Amplifakte (= (Ko)Transkripte) untersucht. Die Ergebnisse wurden in Abb.38 zusammengefasst, ausführliche Darstellungen der Ergebnisse sind im Anhang unter VIII.4 aufgeführt.

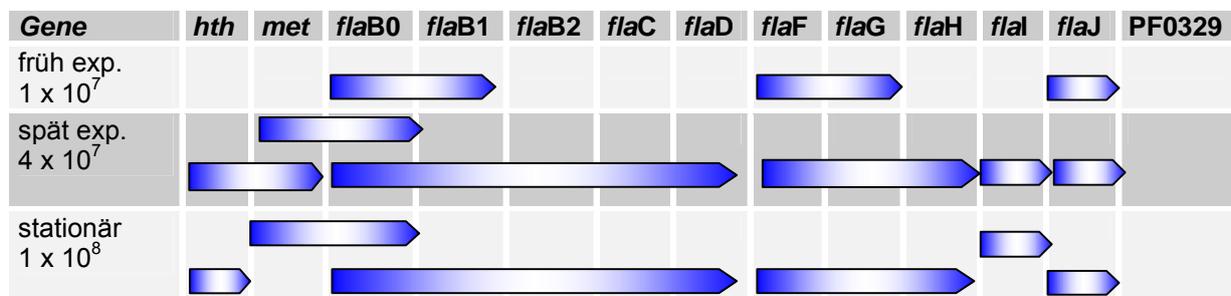


Abbildung 38: Nachgewiesene (Ko)transkripte in Abhängig von der Wachstumsphase
Die Genabfolge ist zur besseren Orientierung invertiert dargestellt.

In diesem Fall wurden in Abb.38 alle gefundenen Transkripte dargestellt. Die Transkription verändert sich im Verlauf der unterschiedlichen Wachstumsstadien deutlich. Es werden zu späteren Zeitpunkten der Wachstumskurve vermehrt Gene des *fla*-Genclusters abgelesen, wobei sich die Muster hierbei deutlich unterscheiden können. Insgesamt wird deutlich, dass der Aufbau der Flagelle wohl in Stufen abläuft, wobei zu verschiedenen Zeiten unterschiedliche „Bausteine“ benötigt werden.

2.2 Versuch des Nachweises spezifischer Transkripte mittels Northern Blotting und ³²P-Markierung

Mittels Northern Blotting und radioaktiver Markierung möglicher (Ko)Transkripte durch radioaktiv markierte Sonden, sollte ein *quantitativer* Vergleich der Transkriptmengen im Verlauf der Wachstumskurve aufgestellt werden. Zudem könnten somit mögliche Fehler beim Umschreiben der RNA in cDNA umgangen werden. Alle Tests wurden zunächst zur Etablierung des Systems mit einem konstitutiv transkribierten Gen von *P. furiosus*, der Pyruvatkinase, durchgeführt. Trotz mehrfacher Veränderung der Versuchsvariablen konnte kein Signal erhalten werden. Ein weiterer Test mit *E. coli*-mRNA und der konstitutiv transkribierten GAPDH (Glycerinaldehydphosphat-Dehydrogenase) als Sonde führten bislang zu keinem Signal, was vermuten lässt dass das verwendete System grundsätzliche Funktionsprobleme aufwies.

2.3 Transkriptkarte des Operonbereiches

Nach der Untersuchung des Operons konnte die in Abb.39 gezeigte Transkriptkarte erstellt werden. Hierbei wurden die in III.B.2.1 gezeigten Ergebnisse zusammengefasst. Zudem wurden weitere Analysen hinzugefügt (s.u.).

Zunächst einmal wurden in zahlreichen Versuchen alle *möglichen Transkripte* ermittelt. Diese sind in der Abb.39 unter der Bezeichnung „*allgemeine Transkription*“ dargestellt. Die gefundenen Transkripte in den verschiedenen Wachstumsstufen weichen davon in gewissen Punkten ab. Dies verdeutlicht aber umso mehr, dass hier eine übergeordnete Regulation zu Grunde liegt.

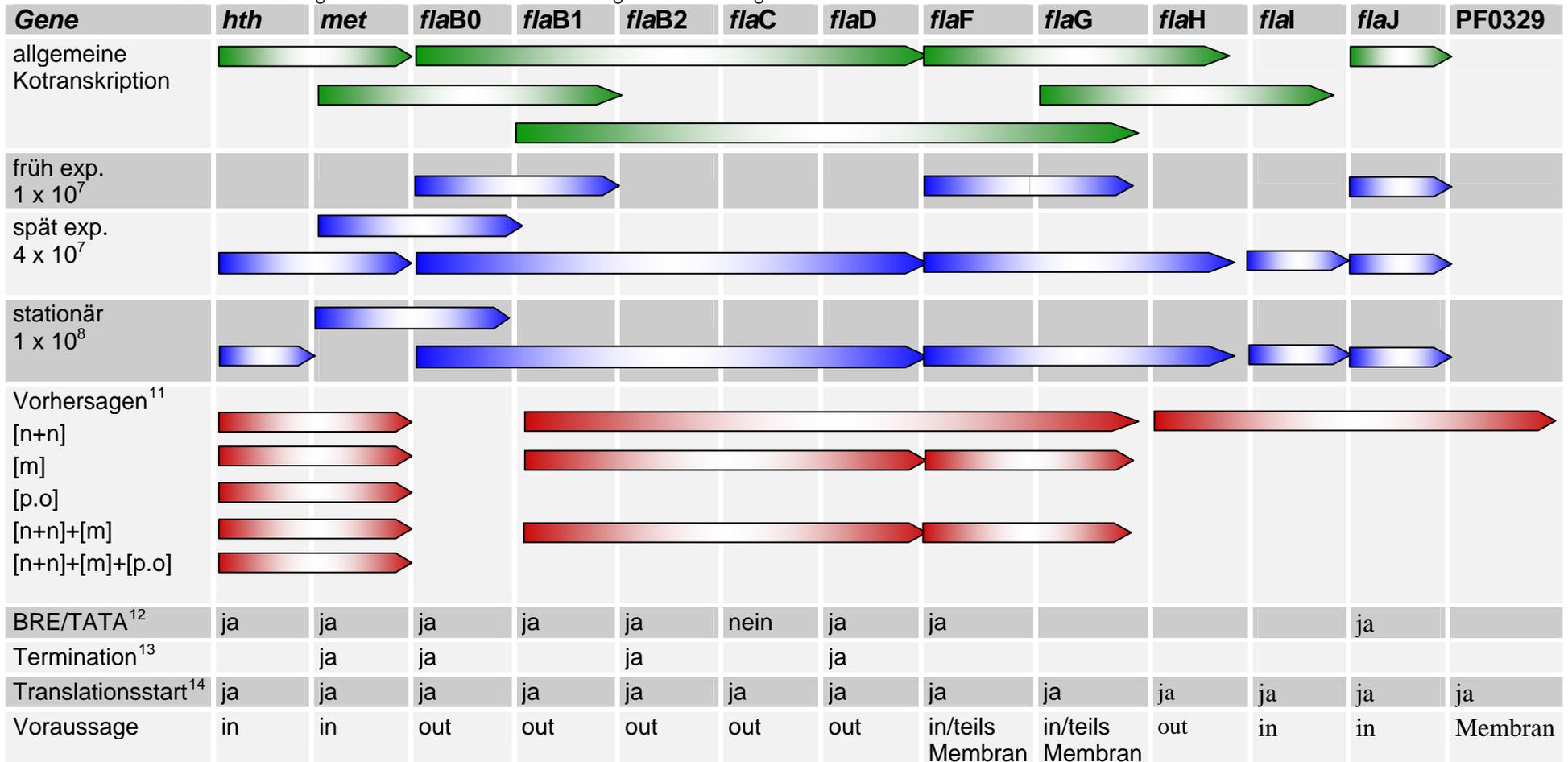
Besonders augenfällig erscheint die Kotranskription der *met*-Genes mit *flaB0*. Das Gen *hth* wird zudem auch mit *met* gemeinsam transkribiert. Außerdem werden statt weniger Haupttranskripte in diesem Fall mehrere, überlappende Transkripte vorgefunden. Auch Gene, die sich um wenige Aminosäuren überlappen, können kotranskribiert werden, wie im Fall von *flaC/flaD* und *flaD/flaF*. Eine gemeinsame Transkription der *fla*-Gene mit PF0329 konnte nicht gezeigt werden.

Die Genprodukte verändern sich *im Laufe der Wachstumskurve*. Es werden vermehrt Gene abgelesen, bzw. Transkripte der abgelesenen Gene gefunden, deren Funktion zum großen Teil nicht geklärt werden konnte, die aber vermutlich in Zusammenhang mit der Assemblierung der Flagelle stehen.

In Abb.39 ist eine *Analyse auf ein potentiell Operon nach Tran et al.* (2006; <http://csbl.bmb.uga.edu/~tran/operons>) eingefügt. Diesen Berechnungen liegen verschiedene Berechnungsalgorithmen zu Grunde, die unterschiedlich kombiniert und verrechnet wurden. Des Weiteren wurde der entsprechende genomische Bereich auf TATA-Boxen und BRE-Elemente hin untersucht. Es wurde auch überprüft, ob T-reiche Abschnitte nach den Genen

gefunden werden konnten, da diese als mögliches Terminationssignal der Transkription angesehen werden. Bislang ist aber keine echte Konsensussequenz bekannt und auch innerhalb des Operons konnte durch Sequenzvergleiche keine Konsensussequenz nachgewiesen werden. Alle Genstartpunkte wurden auf G-reiche Elemente hin untersucht, wie von Torarinsson *et al.* (2005) beschrieben, wobei für alle Gene ein identisches GGTG-Element nachgewiesen werden konnte. Dieses dient als sicheres Erkennungssignal für die Translationsmaschinerie (Torarinsson *et al.*, 2005). Unter Verwendung der Programme pSORTb 2.0.4 (Gardy *et al.*, 2005) und TMHMM version 2.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/>) wurden Voraussagen zu der möglichen Lokalisation der einzelnen Proteine berechnet.

Abbildung 39: Darstellung der Ergebnisse zur Untersuchung des *fla*-Genclusters.
Die Genabfolge ist zur besseren Orientierung invertiert dargestellt.



¹¹ Vorhersagen bezüglich des Operons nach Tran *et al.* (2006); [n + n]: Ergebnis des Neural Network (NN) operon predictor; [m]: Microarray-Ergebnisse; [p.o.]: Putative operon list.
¹² TATA-Boxen bei einer Position von ca. -50 bp stromabwärts des Translationsstartes; BRE- Elemente direkt stromabwärts vor der TATA-Box
¹³ T-reiche Regionen nach dem Stop-Codon
¹⁴ GGTG-Wiederholung (Torarinsson *et al.*, 2005)

IV. DISKUSSION

Im Rahmen dieser Arbeit konnten neue, bislang einzigartige Funktionen der Zellanhänge von *Pyrococcus furiosus* aufgezeigt und Licht auf den zeitlichen Verlauf des Assemblierungsmechanismus des Organells geworfen werden.

Die Zellanhänge von *P. furiosus* unterscheiden sich dabei deutlich von den bakteriellen Geißeln. Biochemische, genetische und auch ultrastrukturelle Untersuchungen zeigen zunehmend, dass die archaeellen Flagellen in vielerlei Hinsichten mehr den Typ IV Pili ähneln, einer Struktur, die für eine Fortbewegung namens twitching motility benötigt wird (Bardy *et al.*, 2004; Bardy *et al.*, 2003b; Cohen-Krausz *et al.*, 2002; Peabody *et al.*, 2003; Thomas *et al.*, 2001a). Dabei handelt es sich, ähnlich dem Auswerfen eines Ankers, um ein "Auswerfen" der Pili, einer Verankerung und einer anschließenden Retraktion des Pilus, wodurch es zu einer schnellen, ruckartigen Fortbewegung der Zelle selbst kommt. Auch wenn Daten über die Flagellen der Archaeen im Vergleich zu den Geißeln der Bakterien eher rar sind, konnten in den letzten Jahren viele neue Erkenntnisse gewonnen werden. Vorrangig sind hier, neben der vorliegenden Arbeit, die Daten aus den Gruppen K.F. Jarrell, D. Oesterhelt und S.V. Albers zu nennen. Im Folgenden soll gezeigt werden, dass *P. furiosus* außer der Motilität, die typischerweise mit Flagellen verbunden wird, durch seine Flagellen ungewöhnliche neue Fähigkeiten erhält.

1. Die Flagelle von *P. furiosus* wird aus Flagellinen aufgebaut und glykosyliert

Um mehr Erkenntnisse über die Zellanhänge von *P. furiosus* gewinnen zu können, mussten diese isoliert werden. Hierfür konnte eine Vielzahl von Techniken genutzt werden, welche alle zu einem ähnlichen Resultat führten. Die Flagellen wurden durch Abscheren oder Solubilisierung der Zellmembran von der Zelle selbst entfernt. Bei der nachfolgenden Analyse der Flagellen konnte im SDS-Polyacrylamidgel ein Hauptprotein, später als Flagellin FlaB0 benannt, mit einem Molekulargewicht von 30 kDa nachgewiesen werden (Näther *et al.*, 2006). Durch eine N-terminale Sequenzierung konnte der N-Terminus des isolierten Proteins erhalten werden. Eine Suche des Proteins innerhalb der Datenbank (NCBI) erwies sich als problematisch (s.u.), da die erhaltene Proteinsequenz nicht vollständig der gefundenen Sequenz von FlaB2 im Genom von *P. furiosus* entsprach.

Die archaeelle Flagelle setzt sich typischerweise aus mehreren Untereinheiten der Strukturflagelline zusammen. Auch dies ist ein Unterschied zur bakteriellen Geißel. Im Fall von *P. furiosus* ergab sich zunächst das Problem, dass in den bekannten Datenbanken (NCBI, TIGR) lediglich *ein* Flagellinprotein, FlaB2, annotiert war, welches den typischen Kriterien bereits charakterisierter archaeeller Flagelline entsprach (s.u.). Das zweite annotierte Protein, FlaB1, zeigte nicht den N-terminalen Aufbau eines typischen Flagellins (Näther *et al.*, 2006). Nach Überprüfung dieses Bereiches durch Sequenzierung stellte sich

heraus, dass in dem hinterlegten Contig AE010158.1 (NCBI-Datenbank), in dem die beiden Gene *flaB1* und *flaB2* zu finden waren, ein Fehler vorlag. Durch die Sequenzierung und Alignierung der erhaltenen Sequenzen konnten 771 bp an der Position 352384 ergänzt werden. Nachdem dieser Bereich neu annotiert wurde (nun vorläufig als Contig AE010158.2 bezeichnet), konnte durch eine Analyse der möglichen offenen Leserahmen für *P. furiosus* zunächst ein neuer N-Terminus für *flaB1* festgelegt werden und zudem ein weiteres Flagellin, *flaB0*, nachgewiesen werden. Fehler in sequenzierten und annotierten Genomen von Archaeen und Bakterien in den Datenbanken stellen sich in letzter Zeit als nicht gerade unübliches Problem dar (Adams *et al.*, 2007). Für *P. furiosus* wurde gezeigt, dass sich bei den 2065 Genen der Originalannotation (welche in zwei Datenbanken, NCBI und TIGR, hinterlegt wurden) bei 500 Genen zum Teil erhebliche Unterschiede und bei 170 der vorausgesagten Proteine insbesondere an deren N-Termini Unterschiede um mehr als 25 Aminosäuren ergaben (Poole *et al.*, 2005). Für das vervollständigte Contig AE010158.2 ist folgendes Bild festzustellen: Es gibt drei Flagellinene, *flaB0*, *flaB1* und *flaB2*. Für *flaB1* wurde ein neuer Start des offenen Leserahmens festgelegt, der sich innerhalb des neu hinzugefügten Sequenzabschnittes befindet. Auch *flaB0* befindet sich komplett innerhalb dieses Bereiches. Die Benennung "*flaB0*" erscheint zunächst nicht sehr glücklich, musste sich jedoch an der bereits festgelegten Benennung von *flaB1* und *flaB2* orientieren (Näther *et al.*; 2006). Eine Benennung als *flaA* wurde ausgeschlossen, da das nachgewiesene Gen vergleichsweise kaum Ähnlichkeiten mit den bei *Halobacterium sp.* und *Methanococcus voltae* vorhandenen Genen *flg/flaA* besitzt. Bei dem Protein FlaB0 handelt es sich zudem, wie bereits erwähnt, um das Hauptprotein der Flagelle von *P. furiosus*. Dies konnte durch N-terminale Sequenzierung der Proteinbande aus der Flagellenpräparation gezeigt werden. FlaB1 und FlaB2 konnten bislang weder durch eine N-terminale Sequenzierung, noch durch Analysen mittels HPLC¹⁵ und MALDI-TOF¹⁶ in dieser Fraktion nachgewiesen werden. Unter Verwendung Flagellin-spezifischer Antikörper, konnte FlaB1 und FlaB2 in Western Blot-Experimenten sehr wohl innerhalb der 30 kDa-Flagellinbande der Original-Flagellenpräparation nachgewiesen werden. Vermutlich liegen diese beiden Proteine aber in so geringen Mengen in der Gesamtstruktur der isolierten Flagelle vor, dass sie im Gros des Hauptflagellins FlaB0 mit den verwendeten Techniken der Sequenzierung nicht nachgewiesen werden konnten.

Eine weitere Besonderheit stellen posttranslationale Modifikationen der Flagelline dar. Als auffälligstes Merkmal ist hier die Modifizierung des Flagellins durch eine Signalpeptidase zu nennen. Alle Prä-Flagellin-Proteine besitzen ein kurzes Signalpeptid, welches im Regelfall mit einer basischen Aminosäure und einem Glycin endet, ähnlich wie bei den bereits

¹⁵ HPLC: High Performance/Pressure Liquid Chromatography

¹⁶ MALDI-TOF: Matrix Assisted Laser Desorption/Ionisation- Time of Flight

eingangs erwähnten Typ IV Pili (Thomas *et al.*, 2001c). Typischerweise zeigen diese Signalpeptide eine Länge von bis zu 12 Aminosäuren, sie können jedoch auch sehr kurz sein, wie z.B. bei *P. furiosus* (und den nächsten Verwandten, *P. abyssi* und *P. horikoshii*). Hier besitzt das Signalpeptid lediglich eine Länge von 3 - 4 Aminosäuren, was für FlaB2 zutrifft und auch im Einklang mit den Proteinen des neu annotierten Gens *flaB1* und des neu hinzugefügten Gens *flaB0* steht.

Als weitere posttranslationale Modifizierung ist die Glykosylierung der archaellen Flagelle zu nennen. Auch diese Tatsache unterscheidet die archaellen Flagellen von bakteriellen Geißeln (die größtenteils nicht glykosyliert werden) und stellt sie in die Nähe der bakteriellen Typ IV Pili (die ebenfalls z.T. Glykosylierungen besitzen). Die Anwesenheit von Glykosylierungen scheint innerhalb der archaellen Flagelline sehr weit verbreitet zu sein. Für *P. furiosus* wurde eine Glykosylierung des Flagellinproteins indirekt mittels PAS-Färbung nachgewiesen. Glykosylierungen wurden über einen Färbungsnachweis¹⁷ auch für viele weitere archaelle Flagelline gezeigt (Faguy *et al.*, 1996; 1992; Kalmokoff *et al.*, 1992; Polosina *et al.*, 1998; Serganova *et al.*, 1995; Southam *et al.*, 1990) oder durch Proteomanalysen für noch nicht weiter charakterisierte Modifizierungen von Flagellinen (Giometti *et al.*, 2001; Mukhopadhyay *et al.*, 2000). Direkte Nachweise der Glykosylierung wurden für *Halobacterium salinarum* (Lechner *et al.*, 1989; Wieland *et al.*, 1985) und *Methanococcus voltae* (Voisin *et al.*, 2005) durchgeführt.

Die Glykosylierung ist somit wohl auch für die mitunter beobachteten Unterschiede zwischen den vorausgesagten, theoretischen und den beobachteten Differenzen im Laufverhalten während einer SDS-PAGE verantwortlich (Bayley *et al.*, 1993; Jarrell *et al.*, 1996 JB; Sumper, 1987; Thomas *et al.*, 2001a). Die Analyse des isolierten Flagellenproteins von *P. furiosus* zeigte ebenfalls Unterschiede im Laufverhalten des Proteins. Das vorausgesagte Molekulargewicht von FlaB0 beträgt ca. 23 kDa, im SDS-Polyacrylamidgel wurde das Protein jedoch mit 30 (bzw. 25) kDa nachgewiesen, was vermutlich auf eine starke Glykosylierung zurückzuführen ist (s.a. Dietl, 2006). Für die beiden weiteren Fla-Proteine, FlaB1 und FlaB2 können in dieser Hinsicht keine Aussagen gemacht werden, da sie in Proteinpräparationen bislang nicht direkt durch N-terminale Sequenzierungen nachgewiesen werden konnten. Giometti *et al.* (2001) wirft den Gedanken auf, dass eine Diskrepanz des Laufverhaltens nicht alleine auf eine bloße Glykosylierung zurückzuführen sei und möglicherweise in den meisten bisher untersuchten Fällen weitere, noch nicht charakterisierte Modifizierungen multiplizierend auf das veränderte Laufverhaltens mitwirken könnten.

Untersuchungen zu den jeweils abgeleiteten Aminosäuren aus den Genen sagen vielfach eine N-verknüpfte Glykosylierung mit der Konsensussequenz (ASN-X-Ser/Thr)¹⁸ voraus (Ng *et al.*, 2006). Für *P. furiosus* konnten für FlaB0 und FlaB1 je 5 und für FlaB2 je 6 dieser

¹⁷ PAS (Periodat-Schiff-Färbung) oder Schwefelthymolfärbung.

¹⁸ X kann jede beliebige Aminosäure darstellen, außer Prolin.

Konsensussequenzen gefunden werden. Archaeelle Flagelline können jedoch bis zu 16 Modifizierungsstellen besitzen, wie im Fall von *Methanothermobacter thermolithoautotrophicus* (Jarrell et al., 2007).

Der N-Terminus der archaeellen Flagellen per se ist sehr hydrophob (Kalmokoff *et al.*, 1991) und es gibt eine bedeutende Sequenzähnlichkeit zu dem konservierten N-Termini der Typ IV Pili der Bakterien (Faguy *et al.*, 1994a). Dies bezieht sich jedoch nur auf den *N-Terminus* der Flagelline. Der restliche Verlauf des Proteins zeigt, entgegen früherer Behauptungen (Faguy *et al.*, 1994a), nur zu **5 – 12%** gleiche Aminosäuren, was vergleichsweise keiner sehr großen Ähnlichkeit entspricht¹⁹. In diesem Zusammenhang wird darauf hingewiesen, dass sich hier in der Diskussion nicht auf Homologien, sondern auf *Ähnlichkeiten* bezogen wird. Homologien werden im Sinne der Definition für Proteine angewendet, die einen gemeinsamen Ursprung besitzen, was für bakterielle Typ IV Pili und die Flagellen der Archaeen nicht behauptet werden kann und soll. Die Bezeichnung Ähnlichkeit bezieht sich somit in diesem Sinne nur auf *identische Aminosäuren* die sich durch Vergleiche in Sequenzalignments ergeben (Vergleiche mit ClustalW, Bioedit etc.). Werden die drei *P. furiosus*-Flagelline untereinander verglichen, so ergeben sich zu 36% identische Aminosäuren. Zieht man jedoch einen Vergleich zwischen den *P. furiosus*-Flagellinen mit weiteren archaeellen Flagellinen²⁰, so können je nach verwendeten Sequenzen Werte von 0,3 - 25% identischer Aminosäuren erreicht werden. Insofern mögen bei diesen Alignments die Prozentzahlen der Ähnlichkeit im Vergleich mit den Typ IV Pilinen sehr hoch (oder niedrig) erscheinen, je nachdem, welche Auswahl an zu verrechnenden Sequenzen für das Sequenzalignment getroffen wurde.

Die Sequenzvergleiche der *P. furiosus*-Flagelline waren auch der Ausgangspunkt zur Generierung Flagellin-spezifischer Antikörper. Hierfür sollten die einzelnen Flagelline, FlaB0, FlaB1 und FlaB2, kloniert werden. In zahlreichen Experimenten hatte sich gezeigt, dass eine Klonierung des vollständigen Proteins, mit oder ohne Signalpeptid, bisher kaum möglich ist. Egal ob in einem bakteriellen oder eukaryotischen System gearbeitet wird, die Expression des Proteins scheint sich toxisch auf die Zellen auszuwirken (Dietl, 2006; Wimmer, 2007). Möglicherweise ist hierfür der stark hydrophobe N-Terminus der Flagellin-Proteine verantwortlich. FlaB2 wurde als "Modellprotein" in drei Abschnitte eingeteilt, dann als "N-Terminus", "Mittelteil" und "C-Terminus" bezeichnet. Diese Peptidfragmente wurden kloniert

¹⁹ Verwendung fanden die Daten von *Pseudomonas aeruginosa* (siehe hierzu auch: Peabody *et al.*, 2003). Es wurde jeweils mit PilA, dem als Hauptpilin geltendem Protein verglichen und PilE, PilV, PilW, PilX, FimU und FimT, die als Nebenpiline gerechnet werden können.

²⁰ Verglichen wurde mit den nächsten Verwandten innerhalb der *Thermococcales* (deren Genomdaten verfügbar waren): *Pyrococcus abyssi*: PAB1378 – PAB1380; *Pyrococcus horikoshii*: PH0546 – PH0550; *Thermococcus kodakarensis*: TK0038 – TK0042. Des Weiteren wurden Organismen herangezogen, deren Genomdaten verfügbar waren und aktuell Mittelpunkt der Untersuchungen der Flagelline sind: *Halobacterium sp.*: FlaA1a, Fla1b, FlaA2, FlaA3, FlaB1 – FlaB3; *Methanococcus janaschii*: MJ0891 – MJ0893; *Methanococcus maripaludris*: FlaB1 – FlaB3; *Methanococcus vaniellii*: FlaB1 – FlaB3

und exprimiert (Wimmer, 2006). Außer für den N-Terminus konnte das jeweilige Peptid exprimiert werden und somit Antikörper generiert werden. Dies bestärkt die Annahme, dass der stark hydrophobe N-Terminus für die Toxizität in nicht-archaeellen Expressionssystemen verantwortlich ist. Weiterhin war so natürlich auch eine Expression der Peptidabschnitte der beiden weiteren Flagellinproteine, FlaB0 und FlaB1, von Interesse. Da durch Sequenzvergleiche gezeigt werden konnte, dass die drei Flagelline sich am stärksten in den "Mittelteilen" des Proteins *unterschieden*, wurden in dieser Arbeit nur die beiden Mittelteile des jeweiligen Proteins kloniert und exprimiert. Für beide "Mittelteile" konnten zudem erfolgreich Antikörper generiert werden²¹. In späteren Immunmarkierungsexperimenten sollten diese dann eine Lokalisation der Proteine innerhalb der Struktur des Filaments ermöglichen.

2. Funktionsvariabilität der Flagellen von *P. furiosus*: Fortbewegung, Zell-Zell-Verbindungen und gezielte Anheftung

In den bisherigen Erläuterungen wurde bereits mehrfach diskutiert, dass die archaeelle Flagelle und die bakterielle Geißel deutlich unterschiedlich sind. Eine *Abwesenheit* von "Homologen" im Sinne der Flagellenstruktur, -funktion- oder -assemblierung in allen bekannten und bislang vollständig sequenzierten Archaeengenomen spricht dafür, dass die Flagelle aus einzigartigen, für Archaeen spezifischen Genprodukten aufgebaut ist (Faguy *et al.*, 1999).

Erstaunlicherweise spiegelt die archaeelle Flagelle die *Funktion* der bakteriellen Flagelle in der Hinsicht wieder, dass es sich bei beiden Zellfortsätzen um eine rotierende Struktur handelt, die eine Fortbewegung im Sinne von Schwimmen ermöglicht (Berg *et al.*, 1973; Silverman *et al.*, 1974; Alam *et al.*, 1984; Koch *et al.*, 2005).

H. salinarum zeigt ein Vor- und Rückwärtsschwimmen in Verbindung mit einem Umschalten zwischen "clockwise" (CW)- und "counter-clockwise" (CCW)-Rotation (Alam *et al.*, 1984). Die CW-Rotation erzeugt dabei eine Schubkraft, mit Hilfe derer sich die Zelle wie mit einem Propeller nach vorne bewegen kann. Das Umschalten zur CCW-Rotation resultiert in einer Umkehrung der Zelle, so dass sie mit den Flagellen voraus schwimmt (Koch *et al.*, 2005). Dies ist ungewöhnlich im Vergleich mit dem bakteriellen Geißel-System. Hier findet z.B. im Fall von *E. coli* ein regulierter Wechsel zwischen dem Schwimmvorgang (CCW) und einem Taumeln (CW) statt (Larsen *et al.*, 1974).

Über den mechanistischen Ablauf des Schwimmens können zum jetzigen Zeitpunkt für *P. furiosus* nur wenige Aussagen getroffen werden. Die Flagelle zeigt vermutlich ebenfalls eine rotierende Bewegung. Betrachtet man nochmals die hohe Anzahl von bis zu 50 Flagellen pro

²¹ Diese Antikörper wurden dann folgendermaßen bezeichnet: anti-'FlaXY' (gibt an, dass es sich um den mittleren Teil des ursprünglichen Proteins handelt).

Zellen, so wird klar, dass es einen starken Regulationsmechanismus geben *muss*, der einzelne Flagellen oder das gesamte Büschel reguliert und koordiniert.

In Bezug auf die Chemotaxis wurde in den bislang sequenzierten und annotierten Archaeengenomen, die über die Datenbanken verfügbar sind eine große Anzahl an Proteinen gefunden, die denen des bakteriellen Chemotaxis-Systems ähnlich sind (Che-Proteine und auch MCPs (methyl-accepting proteins); Jarrell *et al.*, 2007). Die Verbindung dieses ungewöhnlichen archaeellen Motilitätsorganells mit einem Bakterien-ähnlichen Chemotaxis-System ist dabei überraschend. Auch in diesem Fall finden sich die Gene in Clustern angeordnet, diese sind jedoch weniger konserviert, als im bereits beschriebenen *fla*-Gencluster. Eine empfehlenswerte Übersicht und einen Vergleich zwischen archaeellen und bakteriellen Che-Proteinen und MCPs wurden von Szurmant *et al.* (2004) zusammengestellt. Daten wurden in dieser Hinsicht vor allem für *Halobacterium sp.* gesammelt (Marwan *et al.*; 2000; Rudolph *et al.*, 1996; Szurmant *et al.*, 2004).

Die ausführlichsten Untersuchungen zur Chemotaxis auf genetischer Ebene wurden in der Gruppe von D. Oesterhelt durchgeführt. Es konnte gezeigt werden, dass sich die Deletion (und Komplementation) einzelner Che-Proteine direkt auf die Chemotaxis oder Phototaxis von *Halobacterium salinarum* auswirkt (Rudolph *et al.*, 1996).

Für *P. furiosus* erwies es sich als überraschend, dass bei Analysen im Genom *keine* Gene mit Ähnlichkeiten zu den bakteriellen/archaeellen *che*-Genen/Che-Proteinen gefunden werden konnten. Dies erscheint insbesondere ungewöhnlich, da die nächsten Verwandten, *P. abyssi* und *P. horikoshii*, beide einen vollständigen (sogar oft mehrfachen Satz) der Che-Proteine CheA, CheB, CheC, CheD, CheR, CheW und CheY besitzen. Als einziges zum Chemotaxis-System ähnliches Gen/Protein konnte das Gen PF0433 identifiziert werden (GI 18976805; NCBI), welches Ähnlichkeiten zu methylakzeptierenden Proteinen (MCPs) zeigt (Jarrell *et al.*, 2007). Vergleichsweise ist dies jedoch eine geringe Anzahl, da in den meisten Fällen mindestens zwei bis hin zu 18 MCPs gefunden werden können (Jarrell *et al.*, 2007). Dies spricht entweder dafür, dass *P. furiosus* einen komplett neuartigen Satz an Taxis-regulierenden Proteinen besitzt, oder ist möglicherweise wiederum auf eine fehlerhafte Sequenzierung zurückzuführen.

Taxis an sich wurde bereits bei einigen Archaeen untersucht, wobei die Versuche im Wesentlichen physiologischer Natur waren (außer den genetischen Ansätzen zu *H. salinarum*; s.o.). Viele Ansätze orientieren sich dabei an den klassischen Versuchen zur Chemotaxis mit "Lock"- und "Abwehr"-Stoffen (Adler *et al.*, 1973).

Für *P. furiosus* konnte Schwimmverhalten per se durch Analysen im Thermomikroskop ab 75°C festgestellt werden. Dies entspricht auch der unteren Temperaturgrenze des Bereiches, innerhalb welchem *P. furiosus* Wachstum zeigt. Es konnte bis zu Temperaturen

von 95°C getestet werden, wobei *P. furiosus* eine hohe Fortbewegungsgeschwindigkeit besitzt. Für Messungen über 95°C hinaus war das System mit den sensiblen Mikroskopieeinheiten nicht ausgelegt, es wird jedoch vermutet, dass Motilität bis zur oberen Wachstumsgrenze von 103°C vorliegt.

2.1 Struktur

Elektronenmikroskopische Untersuchungen von vielen verschiedenen Archaeen zeigen die folgenden gemeinsamen Eigenschaften ihrer Flagellen. Typischerweise sind sie dünner als die bakterielle Geißel, also meistens nur 10 - 13 nm (Black *et al.*, 1979; Cruden *et al.*, 1989; Fedorov *et al.*, 1994; Jarrell *et al.*, 1989; Southam *et al.*, 1990) im Vergleich zu 20 nm (Jones *et al.*, 1991). Für *P. furiosus* konnte ein Durchmesser der Flagelle von 13 nm bestimmt werden.

Für *P. furiosus* konnte mittels Fourieranalysen gezeigt werden, dass die helikal (vermutlich linksgängig) angeordneten Untereinheiten der Flagelle eine Ganghöhe von 4,4 nm besitzen. Die Frage ob es sich dabei um eine zwei- oder dreiwendelige Helix handelt, steht noch aus. Im Fall von *Halobacterium salinarum* befinden sich 3,3 Untereinheiten per Helixumrundung in einer 19 Å dicken, linksgängigen Helix. Die bakterielle Geißel besitzt hingegen 5,5 Untereinheiten angeordnet in einer 26 Å dicken, rechtsgängigen Helix (Cohen-Krausz *et al.*; 2002). In Tomographieanalysen der Flagellen von *P. furiosus* konnte gezeigt werden, dass die Flagelle im Inneren der Struktur keinen Hohlraum besitzt. Diese Daten stehen in Einklang mit den für Flagellen von *H. salinarum* erzielten Ergebnissen, die eindeutig keinen Hohlraum aufweisen (Cohen-Krausz *et al.*, 2002; Trachtenberg *et al.*, 2005). Es scheint somit unwahrscheinlich, dass die Assemblierung der Flagelle von *P. furiosus* am Ende, also der Spitze der Struktur vollzogen wird. Viel mehr werden die neuen Untereinheiten wohl an der Basis der Flagelle eingebaut, was einer bereits lange bestehenden Hypothese entspricht (Li *et al.*, 2000; Gerl *et al.*, 1988; Jarrell *et al.*, 1996JB). Experimente, bei denen die Flagellen von *Natrialba magadii* durch eine Erniedrigung der NaCl-Konzentration dissoziiert wurden, deuten darauf hin, dass die Flagellen aus dünneren Protofilamenten aufgebaut sind, da sich die Flagellen in dünnere Filamente spalten lassen (Fedorov *et al.*, 1994). Diese Tatsache könnte möglicherweise erklären, warum für *P. furiosus* auch dünnere Filamente, mit ca. 8 nm Durchmesser, nachgewiesen wurden. Diese wurden nicht nur in den Flagellenpräparationen, sondern auch an intakten Zellen selbst gefunden. Ob es sich dabei um funktionelle Einheiten oder fehlassemblierte "Flagellen" handelt, kann nicht gesagt werden.

2.2 Zell-Zell-Verbindungen

Eine vollkommen neue und einzigartige Fähigkeit von *P. furiosus* stellt die Ausbildung von Zell-Zell-Verbindungen zwischen einzelnen *P. furiosus*-Zellen dar. Wie durch mehrere, verschiedene Präparations- und Mikroskopiemethoden gezeigt werden konnte, werden diese Strukturen durch die Flagellen selbst aufgebaut. Diese Zell-Zell-Verbindungen können dabei deutlich von Zellen unterschieden werden, die sich in Zellteilung befinden. Die beschriebenen Strukturen waren an Zellverbänden zu beobachten, bei der eine Zelle *kein* Bündel, die andere am entgegengesetzten Pol der Zelle ein Bündel aufwies. Die Verbindung zwischen den beiden Zellen wurde durch die Flagellen der Zelle ausgebildet, die *kein* offensichtliches, polar angeordnetes Flagellenbündel besaß. In der Originalbeschreibung von *Pyrococcus woesei* wurden dererlei Zellverbindungen bereits als lichtmikroskopische Auffälligkeit beschrieben (Zillig *et al.*, 1987). Die Funktion der Zellverbindungen konnte bislang nicht aufgeklärt werden. Es können jedoch einige Möglichkeiten diskutiert werden. Für *Haloferax* (früher: *Halobacterium*) *volcanii* wurden Zellbrücken beschrieben, für die ein Austausch von genomischer DNA, jedoch nicht von immobilen Plasmiden beschrieben wurde. Es wurde argumentiert, dass keine Vermischung des Cytoplasmas stattfindet und eine cytoplasmatische Kontinuität zwischen den beiden verbundenen Zellen lediglich aus dem Austausch von einzelnen Molekülen besteht (Mevarech *et al.*, 1985; Rosenshine *et al.*, 1989). Für *P. furiosus* konnte eindeutig gezeigt werden, dass die Zellen *nicht* durch eine cytoplasmatische Brücke verbunden werden, sondern dass die Zellverbindung aus aggregierten Flagellen besteht (Näther *et al.*, 2006). Auch die für *Thermococcus coalescens* beschriebene Zellfusion (Kuwabara *et al.*, 2005 und 2007) ist nicht mit den bei *P. furiosus* beobachteten Zell-Zell-Verbindungen vergleichbar.

Als Grund für die Ausbildung von Verbindungen zwischen den Zellen wäre ein Gentransfer innerhalb von *P. furiosus* (oder auch mit anderen Organsimen) denkbar (Näther *et al.*, 2006). Vor dem Hintergrund, dass die Verbindungen zwischen den Zellen variable Längen besitzen können (>2 µm bis <0,2 µm) erscheint ein initialer Kontakt durch die Flagellen stimmig. Durch eine Verkürzung der Zellverbindung könnten die Zellen in einem engeren Kontakt kommen, welcher einen direkten genetischen Transfer erlauben würde (Näther *et al.*, 2006). Die Zellverbindungen stellen somit innerhalb der Archaea eine vollkommen neuartige Struktur dar, deren tatsächliche Funktion es aufzuklären gilt.

2.3 Anheftung

Ein weiterer, neuer Aspekt der in dieser Arbeit nachgewiesen wurde, ist die Fähigkeit von *P. furiosus* (und auch anderen Archaeen²²) sich *gezielt* auf einer Auswahl an Oberflächen anzuheften. Diese Anheftung wird dabei von einzelnen Flagellen vermittelt. Oberflächen wie

²² Bislang wurden in unserem Labor folgende Organismen getestet: *P. furiosus*, *P. woesei*, *Ignicoccus hospitalis*, *Methanococcus voltae*, *Methanothermobacter thermoautotrophicus*, *Methanothermus sociabilis*.

z.B. Stahl oder Glas wurden in keinem der Versuche besiedelt. Eine universelle, nicht spezifische Anheftung kann somit ausgeschlossen werden kann. Es kommt dabei nicht nur zu einer (flächigen) Anheftung der Zellen, es findet danach auch aktive Zellteilung statt. So können in elektronenmikroskopischen Analysen alle Formen der Teilung gefunden werden. Es kann die Ausbildung eines Biofilms beobachtet werden, wobei sich die Zellen dreidimensional anordnen und in diesem Rahmen auch teilen. Zwischen den Zellen dieses Biofilms kommt es zur Ausbildung der oben beschriebenen Zellverbindungen, die durch Flagellen ausgebildet werden. Aber auch einzelne Flagellen stehen mit den sie umgebenden Zellen in Kontakt. Dies führt zu einer neuartigen und starken Quervernetzung des Biofilms (Näther *et al.*, 2006).

Anheftungen auf Oberflächen wurden bislang bei Bakterien für Pili oder pilus-unähnliche Adhäsine (non-pilus adhesin; z.B. Kapselpolymere) oder in vereinzelt Fällen auch für Geißeln beschrieben (Soto *et al.*, 1999; Fletcher *et al.*, 2001). Die hier gezeigten spezifischen Anheftungen waren aber bislang einzigartig innerhalb der Archaeen (Näther *et al.*, 2006).

Dass die Anheftung an Oberflächen tatsächlich durch die *Flagellen* vermittelt wird, konnte durch ein Ablösung der aufgewachsenen Zellen mit Hilfe von Flagellen-spezifischen Antikörpern gezeigt werden. Eine Inhibierung der Anheftung der Zellen durch Zugabe der Antikörper zum Medium war experimentell natürlich nicht möglich, da die Antikörper bei Inkubationstemperaturen von 90°C denaturieren würden. Deshalb wurden die Antikörper erst *nach* erfolgtem Wachstum und Anheftung der Zellen zugegeben. Falls die Anheftung durch die Flagellen vermittelt wird, sollte es so zur Ablösung der Zellen kommen. Es wurde gezeigt, dass die Verwendung von Antikörpern gegen die Gesamt-Flagellenpräparation (anti-Fla Pfu) zur vollständigen Ablösung aller Biofilme bzw. der Zellen führte (Näther *et al.*, 2006).

Bei einem Aufwachsen der Zellen auf Oberflächen konnte zudem ein weiterer Effekt beobachtet werden. *P. furiosus* bildet unter bestimmten Bedingungen eine Glycanschicht aus. Diese Schicht konnte an auf Oberflächen aufgewachsenen Biofilmen durch Detektion mittels Calcofluor nachgewiesen werden (Schopf, 2006). Für Zellen aus der Flüssigkultur konnte keine Glycanbildung nachgewiesen werden (Schopf, 2006). In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass ein Unterschied besteht bei der Ausbildung dieser Glycanschicht zwischen Zellen, die oberflächenexponiert auf, und denen, die "eingeschlossen" in einer Gelritematrix wachsen. Die bereits bestehende Matrix aus Gelrite führt anscheinend zur Ausbildung einer Glycanschicht. Die Zellen, die elektronenmikroskopisch untersucht wurden, hatten z.T. extrem dicke Schichten davon aufgelagert. Diese Glycanschicht und die Bedingungen unter denen sie ausgebildet wird, kann mit der bereits bekannten Ausbildung einer Lipopolysaccharidschicht (LPS) von Bakterien verglichen werden (Christensen, 1989;

Sutherland, 2001; Dolan, 2002). Diese wird bei Wachstum in Biofilmen gebildet wird (Watnick *et al.*, 2000). Auch für Archaeen konnte bereits die Ausbildung von Exopolysacchariden nachgewiesen werden (Nicolaus *et al.*, 1993). Des Weiteren konnte für *Thermococcus litoralis*, einen Verwandten von *P. furiosus* innerhalb der *Thermococcales*, gezeigt werden, dass eine Biofilmbildung auf Polycarbonat (und auch Glas) zur Ausbildung eines Mannose-haltigen Exopolysaccharids führt (Rinker *et al.*, 1996).

Archaeelle und bakterielle Zellhüllen sind sehr verschieden aufgebaut. Archaeen besitzen dabei vergleichsweise einen "simpleren" Aufbau der Zellhülle(n) (König, 1988). Dies schließt möglicherweise aus, dass Archaeen einen vergleichbaren Aufbau der Verankerungsstruktur der Flagelle besitzen wie Bakterien. Bei Bakterien sind die Basalkörperringe innerhalb der Cytoplasmamembran, der Peptidoglycanschicht und der äußeren Membran zu finden. Bislang konnten ringartige Basalkörper nur in wenigen Fällen bei Archaeen beschrieben werden, wie z.B. für *Methanothermococcus thermolithotrophicus* und *Methanospirillum hungatei* (Cruden *et al.*, 1989). Im Regelfall lassen sich die Flagellen-Verankerungsstrukturen der Archaeen jedoch nur sehr schwierig visualisieren. In einigen Fällen konnten nur schlecht charakterisierte knöpfchenartige Strukturen nachgewiesen werden (Bardy *et al.*, 2002a; Jaschke *et al.*, 1994; Kalmokoff *et al.*, 1988; Kupper *et al.*, 1994). Für *P. furiosus* konnte durch eine spezielle Präparationsmethode, durch Solubilisierung der Membran mittels Triton X-114, für 5% der Flagellen an einem Ende der Flagelle eine knopfartige Struktur nachgewiesen werden. Durch Analyse der Proteinpräparationen mittels SDS-PAGE konnte *kein* spezielles neuartiges Protein nachgewiesen werden, welches diese Struktur aufbauen könnte. Durch die wenigen verfügbaren Fakten bleibt die Frage also weiterhin offen, ob Flagellen nur einfach keine ringartige Struktur besitzen oder ob die Struktur so empfindlich ist, dass sie durch die zur Zeit gängigen Präparationsmethoden verloren geht.

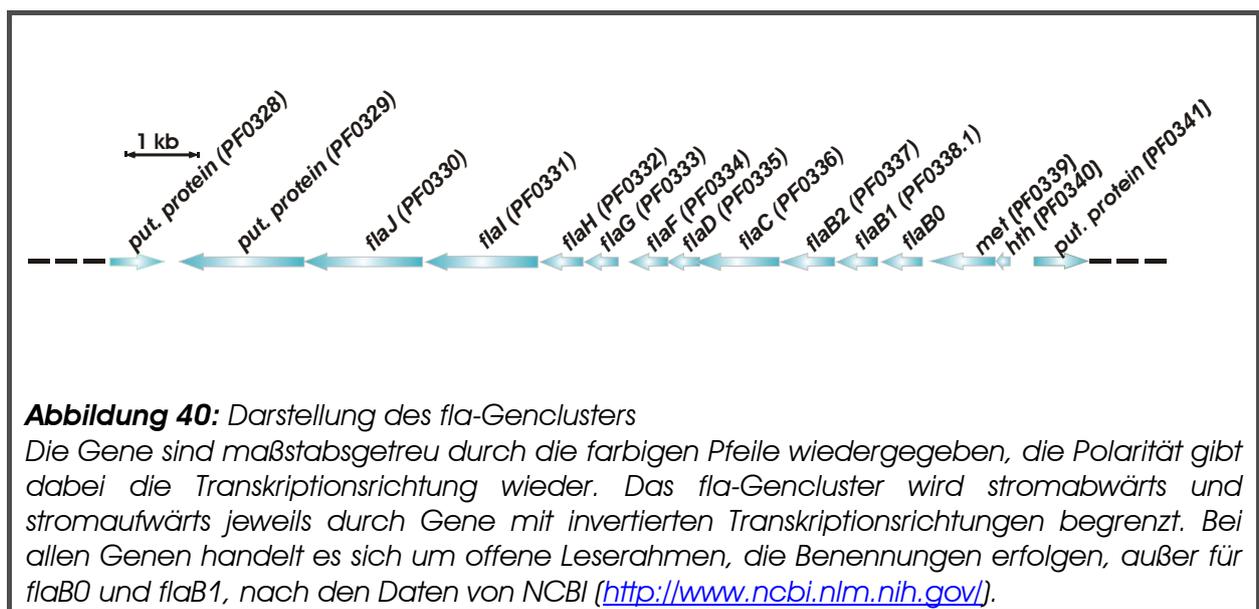
Eine Art Haken zur Verankerung, wie er vom Aufbau der bakteriellen Geißel bekannt ist, konnte für *P. furiosus* nicht nachgewiesen werden. In einigen Fällen wurde diese Struktur aber für Archaeen mittels verschiedener Präparationstechniken gezeigt (Bardy *et al.*, 2002a; Cruden *et al.*, 1989; Kalmokoff *et al.*, 1988). Die Verankerung der archaeellen Flagelle selbst geschieht wahrscheinlich in/an einer Struktur, die sich unterhalb der Cytoplasmamembran befindet. Mittels Tomographieanalysen isolierter Zellmembranen von *P. furiosus* mit inserierenden Flagellenbündeln sollte gezeigt werden, wie sich die Verankerungsstruktur innerhalb der Membran strukturiert. Im Fall der Tomographieanalysen konnten nur Aufnahmen generiert werden, die jedoch keine genügend hohe Auflösung garantieren, um diese Region mittels einer *dreidimensionalen* Darstellung aufzulösen. Durch die gängigen Mikroskopietechniken konnte jedoch eine deutliche "Ausbuchtung" der Zelle an der

Insertionsstelle der Flagellen gezeigt werden. Diese auffällige Struktur war auch schon in der Originalbeschreibung von *P. furiosus* als "granum-ähnliches Körperchen" beschrieben worden (Fiala *et al.*, 1986). Es wird vermutet, dass die polar cap in direktem Zusammenhang mit der Verankerung der Flagelle steht (Alam *et al.*, 1984; Kupper *et al.*, 1994).

3. Die *fla*-Gene sind in einem Cluster angeordnet

Für die Mehrheit der Archaeen, die Flagellen besitzen, können Genloci mit bis zu 13 Genen gefunden werden, denen ein Zusammenhang mit dem Aufbau der Flagelle oder der Flagelle selbst zugeschrieben wird. Dieser Locus setzt sich normalerweise aus einer Abfolge von mehreren Flagellinogenen²³ zusammen, die hintereinander und in gleicher Transkriptionsrichtung angeordnet sind. Nachfolgend können mehrere akzessorische²⁴ Flagellin-Gene (*flaC* – *flaJ*, oder auch nur Teile davon) gefunden werden, die oft ebenfalls hintereinander und in gleicher Transkriptionsrichtung angeordnet vorliegen.

Für *Pyrococcus furiosus* wurde der Aufbau dieses Bereiches in Abb.40 dargestellt. Es zeigt sich eine Abfolge von drei Flagellinogenen, *flaB0*, *flaB1* und *flaB2* und nachfolgend die akzessorischen *fla*-Gene *flaC* – *flaJ*.



Das Gen für die bereits oben beschriebene Signalpeptidase (*flaK*) liegt in den seltensten Fällen innerhalb dieses Bereichs, sondern meistens außerhalb, an einem anderen Ort im Genom (Bardy *et al.*, 2002b; Bardy *et al.*, 2003a). Für *M. voltae* sind zudem Gene bekannt, die für den Transfer der einzelnen Glycaneinheiten auf die Flagelline zur Glykosylierung verantwortlich sind. Auch diese Gene liegen außerhalb des beschriebenen Clusters (Chaban *et al.*, 2006). Für *P. furiosus* sind bislang keine Daten über die Signalpeptidase oder die

²³ Mit Flagellinogenen sind die Gene gemeint, die das Filament bilden.

²⁴ Als akzessorische Gene bzw. deren Proteine, werden Gene/Proteine bezeichnet, die nicht die Struktur der Flagelle, also das Filament selbst aufbauen, sondern bei deren *Assemblierung* mitwirken.

Glykosylierungsmaschinerie der Flagelline bekannt. *FlaK* von *P. furiosus* liegt ebenfalls außerhalb des in Abb.40 gezeigten *fla*-Genclusters.

3.1 Flagellingene

Die am besten untersuchten Gene innerhalb des beschriebenen Gen-Clusters sind die Flagellingene, genannt *flg/flaA* und/oder *flg/flaB*. Von 25 komplett sequenzierten und annotierten Archaeen-Genomen, die in der Datenbank von NCBI verfügbar sind, können für 19 archaeele Vertreter Flagellingene gefunden werden (Jarrell *et al.*, 2007). Durch die Isolierung der Flagellen konnte gezeigt werden, dass sich das Filament aus den Flagellinen aufbaut. Die Flagellingene selbst kommen in Multigenfamilien vor. Im Regelfall liegen 2 – 6 Flagellingene wie bereits oben erwähnt hintereinander vor. Als Ausnahmen sind hier *Sulfolobus*-Arten anzusehen, die nur ein Flagellingene besitzen. Es gibt allerdings auch Archaeen, bei denen sich diese Gene an einem anderen Ort im Genom befinden, wie z.B. *Halobacterium salinarum* (Gerl *et al.*, 1988; Ng *et al.*, 2000). Wie im Fall von *Haloarcula morismorti* können diese sogar auf einem Plasmid liegen (TIGR Annotation). Die Verteilung der einzelnen Flagelline innerhalb der Flagelle selbst ist in den meisten Fällen noch unklar. Für *M. voltae* konnte gezeigt werden, dass es Haupt- ("major") und Neben- ("minor") Flagelline gibt. Werden die Flagellen durch Abscheren von der Zelle entfernt, so konnten vor allem FlaB1 und FlaB2, als Haupt-Flagelline im Filament nachgewiesen werden. In den zurückbleibenden, überstehenden Reste der Flagelle an den Zellen, konnte hauptsächlich das Protein FlaB3 nachgewiesen werden, dass daher als Neben-Protein gilt (Bardy *et al.*, 2002a). Deletionen von FlaB3 in *Methanococcus maripaludis* hatten keinen sichtbaren Effekt auf die Zellen. Sie waren sowohl motil und besaßen auch Flagellen. Deletionen in FlaB1 und FlaB2 in *M. maripaludis* führten jedoch zu Zellen ohne Flagellen, die auch keinerlei Motilität aufwiesen. Dies stützt die These, dass die Assemblierung nach dem vorgeschlagenen Modell, vergleichbar zu den bakteriellen Typ IV Pili, abläuft. Zunächst wird das Flagellenfilament aus den Hauptproteinen FlaB1 und FlaB2 aufgebaut. Der Haken, bestehend aus FlaB3, wird jedoch erst später assembliert. Eine Deletion von FlaB3 hat deshalb wohl keinen Effekt auf die Assemblierung der Flagelle, da es vermutlich erst am Ende des Assemblierungsprozesses benötigt wird (Chaban *et al.*, 2007).

Für *P. furiosus* ist die Verteilung der einzelnen Flagelline noch unsicher. Da durch Proteinsequenzierungen der Flagellenpräparationen bislang nur FlaB0 nachgewiesen werden konnte (s.o.), wird angenommen, dass FlaB0 das Hauptprotein der Flagelle darstellt. Über die Anordnung von FlaB1 und FlaB2 kann keine endgültige Aussage gemacht werden.

3.2 Akzessorische Flagellinene

Die Lokalisation der Gene *flaC* – *flaG* zwischen den Strukturflagellinen *fla(A)B* und dem Gencluster *flaHIJ* legt nahe, dass diese vermutlich an der Assemblierung der Flagelle beteiligt sind (Kalmokoff *et al.*, 1991; Thomas *et al.*, 2001b). Zudem spricht eine nachgewiesene gemeinsame Kotranskription von Flagellinengen mit den akzessorischen Flagellinengen (Kalmokoff *et al.*, 1991; Thomas *et al.*, 2001b) ebenfalls dafür (s.u.). Im Fall von *H. salinarum* besitzen die Gene die entgegengesetzte Transkriptionsrichtung zu den Strukturflagellinen, was zwar eine Kotranskription ausschließt, aber natürlich nicht eine Koregulation. Innerhalb der Euryarchaeota, die Flagellen aufweisen (*Pyrococccen*, *Methanococccen* und *Thermoplasmatales*), werden bei einem Vergleich der Sequenzen sehr starke Ähnlichkeiten zwischen diesen Proteinen gefunden (Ng *et al.*, 2006). Dies muss aber nicht immer der Fall sein. Innerhalb der Crenarchaeota sind die Ähnlichkeiten hingegen sehr schwach, die Gensätze *flaC* – *flaG* zum Teil auch gar nicht vorhanden (Jarrell *et al.*, 2007). Dies legt den Schluss nahe, dass es möglicherweise auch alternative Gensätze mit gleichen oder ähnlichen Funktionen gibt (Ng *et al.*, 2006). Für die potentiellen Proteine FlaC und FlaD von *P. furiosus* konnte durch Analysen mit "pSORTb v.2.0" (Gardy *et al.*, 2005) berechnet werden, dass sie möglicherweise intrazellulär vorliegen. Beide Proteine besitzen zudem laut Voraussage eine coiled-coil Proteindomäne ("Paircoil", Berger *et al.*, 1995). Diese Sekundärstruktur ist häufig bei Proteinen zu finden, die am Proteintransport, der Regulation des In- bzw. Efflux oder auch am Aufbau der bakteriellen Flagelle bzw. der Typ IV Pili (Rose, 2005; Delahay, 2002, Parge, 1995) beteiligt sind. Im Fall von *M. voltae* konnte bereits experimentell gezeigt werden, dass FlaC, FlaD und FlaE²⁵ membranassoziiert vorliegen (Thomas *et al.*, 2001b). Bei FlaF und FlaG von *P. furiosus* handelt es sich den Voraussagen zufolge um Proteine, die jeweils eine Transmembrandomäne aufweisen ("pSORTb v.2.0", Gardy *et al.*, 2005). Für beide Proteine wurde ein Signalpeptid vorausgesagt, wobei für den Großteil der zwei Proteine jeweils eine cytoplasmatische Lokalisation propagiert wird ("SignalP", Nielsen *et al.*, 1997; Bendtsen *et al.*, 2004).

Das *flaC* – *flaG*-Cluster wurde *nur* in Archaeen gefunden, die auch *Flagellen* besitzen. Dieses Cluster konnte bislang nicht innerhalb der Bacteria nachgewiesen werden (Jarrell *et al.*, 2007). In Verbindung mit der Tatsache, dass Deletionsmutanten in den Genen *flaC*, *flaF* und *flaG* im Fall von *Methanococcus maripaludis* zu Zellen/Mutanten führten, die nicht motil waren und auch keine Flagellen besaßen (Chaban *et al.*, 2007), kann folgendes vermutet werden: es handelt sich zum Einen um einen Gensatz, der archaeenspezifisch vorliegt. Das Weiteren steht dieser Gensatz mit größter Wahrscheinlichkeit in Zusammenhang mit der Assemblierung bzw. der Funktion der Flagelle oder der Flagellenstruktur selbst (Ng *et al.*, 2006).

²⁵ Für *P. furiosus* existiert kein Protein FlaE, das Protein FlaE von *M. voltae* ist jedoch mit FlaD von *P. furiosus* gleichzusetzen (u.a. durch Sequenzalignments überprüft).

Innerhalb der Flagellin-assoziierten Gene stellt das *flaHIJ*-Cluster das am stärksten konservierte Motiv dar. Diese Gene können bei allen Archaeen nachgewiesen werden, die auch Flagelline besitzen (Jarrell *et al.*, 2007). Das Cluster *flaHIJ* ist vermutlich am Export der Flagelline beteiligt. Ähnlich wie *flaK*, besitzen *flaI* und *flaJ* Ähnlichkeiten zu Proteinen des bakteriellen Typ IV Pili Systems. *FlaI* weist ein Walker Box A Motiv²⁶ auf (Bayley *et al.*, 1998). Auch für *P. furiosus* konnte für *FlaI* dieses Motiv nachgewiesen werden. *FlaI* besitzt mit diesem Motiv eine sehr große Ähnlichkeit zu ATPasen, die eine wichtige Rolle bei der Verlängerung und Retraktion der Typ IV Pili spielen (*PilT/PilB* in *Pseudomonas aeruginosa*: Bayley *et al.*, 1998 und *TadA* in *Actinobacillus actinomycetemcomitans*: Kachlany *et al.*, 2000). Im Labor von S.V. Albers und A.J.M. Driessen konnte gezeigt werden, dass *FlaI* von *Sulfolobus solfataricus* eine divalente kationenabhängige ATPase-Aktivität besitzt. Ob es für *FlaI* zu einer Ausbildung von Homohexameren kommt, wie im Fall von *PilT* (Forest *et al.*, 2004) oder auch *BfpE* (Crowther *et al.*, 2004) ist noch nicht klar.

Bei *FlaJ* handelt es sich um ein Membranprotein, welches Sekundärstrukturanalysen zufolge mehrere Transmembrandomänen besitzt. Für *FlaJ* von *P. furiosus* wurden mittels verschiedener Programme ("TMHMM v.2.0": <http://www.cbs.dtu.dk/services/> und HMMTOP v.2.0, Tusnády *et al.*, 1998 und 2001) 9 - 10 Transmembrandomänen vorausgesagt. Das Protein besitzt zudem laut der Voraussagen ein Signalpeptid.

Ähnlichkeiten bestehen auch hier zum bakteriellen Typ IV Pili System. Dort gibt es einen konservierten *PilC/TadB* Membrankomplex (Kachlany *et al.*, 2000; Peabody *et al.*, 2003). Nachdem *PilC* mit der korrespondierenden ATPase des Typ IV Pili Systems interagiert, wäre es zumindest denkbar, dass *FlaI* (als potentielle ATPase) in der gleichen Weise mit *FlaJ* interagiert und ebenso einen funktionellen Komplex bildet. *FlaH* besitzt ebenfalls ein Walker Box A Motiv (Thomas *et al.*, 2001c), welches jedoch keine besonderen Ähnlichkeiten zu Proteinen des Typ IV Pili Systems oder weiteren bakteriellen Proteinen aufweist. Möglicherweise könnte es sich jedoch um eine potentielle ATPase handeln (Albers *et al.*, 2005; Thomas *et al.*, 2001c). Von Albers *et al.* (2005) wurde vorgeschlagen, dass *FlaI* und *FlaJ* eine Art Minimalassemblierungskomplex für das Sekretionssystem der archaeellen Flagelle darstellen könnte. Die universelle Assoziation von *FlaH* mit *FlaI* und *FlaJ* auf genomischer Ebene bzw. in archaeellen Operons scheint darauf hinzudeuten, dass es sich bei *FlaH* ebenfalls um eine Komponente handeln könnte, die im Transport/Export-System der Flagelle benötigt wird. Voraussagen zu Lokalisation siedeln *FlaH* von *P. furiosus* membranassoziiert an, wobei der Großteil des Proteins wohl intrazellulär vorliegt.

Einige Archaeen besitzen zwei oder mehr Kopien des gesamten *flaHIJ* Satzes oder von Teilen davon. Auch für *P. furiosus* finden sich jeweils eine weitere Kopie von *flaI* (PF0994; GI

²⁶ Als **Walker Box A** Motiv wird eine bestimmte Sequenzabfolge bezeichnet, von der bekannt ist, dass sie als Nukleotid-Bindestelle dient. Im Fall von *FlaI* konnte für alle getesteten Sequenzen von *FlaI* (Organismen: *P. furiosus*, *P. abyssi*, *P. horikoshii*, *P. woesei*, *T. kodakarensis*, *M. janaschii*, *Halobacterium sp.*, *M. maripaludis*, *M. vanielli*) die folgende Aminosäureabfolge festgelegt werden: **GETASGKT**

18977366; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) und *flaJ* (PF0992; GI 18977364) im Genom, außerhalb des oben gezeigten Clusters. Die direkte Lokalisation eines Sets im *fla*-Gencluster steht wohl in Zusammenhang mit dem Export der Flagelline, während der weitere, zusätzliche Satz am Export von anderen Substraten beteiligt sein könnte. Sowohl für *H. salinarum* (Patenge *et al.*, 2001) als auch für *M. voltae* (Thomas *et al.*, 2001b) ließ sich zeigen, dass die *flaI* und *flaJ* Gene in der Nachbarschaft der anderen *fla*-Gene/des Clusters benötigt werden für die Assemblierung der Flagelle. Dies war der Fall wenn bei *H. salinarum* in *flaI* eine inframe-Deletion (Patenge *et al.*, 2001) eingeführt wurde oder eine Inaktivierung durch ein Insert von *flaJ* in *M. voltae* vorgenommen wurde, was zu Zellen ohne Flagellen führte (Thomas *et al.*, 2001b). In diesen beiden Fällen ist also klar, dass ein weiterer Satz von *flaI* oder *flaJ*-Genen an anderen Stellen im Genom die Deletion des untersuchten *flaI* oder *flaJ*-Gensatzes nicht kompensieren kann (Chaban *et al.*, 2007). Obwohl bislang nicht experimentell bestätigt, liegt es nahe, für *P. furiosus* anzunehmen, dass auch dieser zusätzliche Satz der Gene *flaIJ* die gleichen Eigenschaften aufweist, wie für *H. salinarum* oder *M. voltae* beschrieben, und die Funktionen der Gene *flaIJ* im Cluster wohl nicht kompensieren kann.

4. Das *fla*-Gencluster – Untersuchungen zur Kotranskription

Es ist bekannt, dass die Flagellin-Gene mit den stromabwärts gelegenen akzessorischen Flagellinogenen kotranskribiert werden können (Kalmokoff *et al.*, 1991; Thomas *et al.*, 2001b). Im Fall von *H. salinarum* sind diese Flagellin-assoziierten Gene direkt neben Flagellin-Genen angeordnet, wobei aber die Orientierung der zwei Gencluster invertiert ist und somit eine Kotranskription ausschließt, jedoch nicht unbedingt eine Koregulation. Bei *P. furiosus* findet sich die in Abb.40 gezeigte Anordnung der *fla*-Gene innerhalb eines Clusters. Die Annahme, dass diese kotranskribiert werden, begründet sich nicht nur aus der räumlichen Nähe. Es war für einen der näheren Verwandten, *Thermococcus kodakarensis* (früher *Pyrococcus kodakarensis*) gezeigt worden, dass einige Gene miteinander kotranskribiert werden (Kalmokoff *et al.*, 1991; Nagahisa *et al.*, 1999, Thomas *et al.*, 2001b).

In dieser Arbeit war von Interesse, die Organisation der Transkription im gesamten *fla*-Gencluster zu untersuchen und zu prüfen, ob es sich um ein Operon handelt. Es fällt auf, dass sich möglicherweise weitere Gene innerhalb des Clusters befinden, die durch die Namensgebung zunächst keinen direkten Bezug zu den *fla*-Genen besitzen (Abb.40). Stromaufwärts des *fla*-Genclusters liegt das *hth*-Gen. Hierbei handelt es sich um ein Gen, für das als mögliche Struktur ein Helix-turn-helix-Motiv vorausgesagt wird. Proteine mit diesem Strukturmotiv binden an DNA und können so regulierend auf die Genexpression einwirken (Aravind *et al.*, 1999 und 2005). Des Weiteren findet sich zwischen *hth* und *flaB0* das Gen *met*, bei dem es sich wahrscheinlich um eine Methyltransferase handelt. Stromabwärts

gesehen des *fla*-Genclusters findet sich das Gen PF0329 (GI 33359469), für das keine Funktion angegeben wurde. Die beschriebenen Gene werden jeweils stromaufwärts und stromabwärts von Genen mit invertierter Leserichtung begrenzt. Die räumliche Nähe der *fla*-Gene und der weiteren Gene *innerhalb* dieses eingegrenzten Bereiches legt eine mögliche Kontranskription nahe. Dies könnte somit für eine mögliche Funktion der drei Genprodukte von *hth*, *met* und PF0329 bei der Assemblierung oder der Regulation der Assemblierung der Flagelle sprechen.

Tran *et al.* (2005) sagen mit einem Programm zur Voraussage von Operonen mehrere Kotranskripte in dem hier untersuchten Gencluster voraus. In Abb.41 sind die Ergebnisse verschiedenster Berechnungsmethoden und die Verrechnungen einzelner Methoden zusammengefasst. Für *flaB0* liegen natürlich keine Daten vor, da das Gen bislang noch nicht in den Datenbanken hinterlegt ist. Interessant erscheint hier, dass folgende mögliche Kotranskripte berechnet wurden: *hth/met*, *flaB1/flaB2/flaC/flaD* und *flaF/flaG* (oder auch ein gemeinsames Transkript *flaB1/flaB2/flaC/flaD/flaF/flaG*) und *flaH/flaI/flaJ/PF0329*.

In der vorliegenden Arbeit wurden mRNA-(Ko)Transkripte mittels indirekt RT-PCR²⁷ nachgewiesen. Dazu werden die jeweils vorhandenen Transkripte in voller Länge in cDNA umgeschrieben. Durch eine nachfolgende PCR können dann durch die Wahl verschiedener Primer wiederum die ursprünglichen Transkripte nachgewiesen werden. Es können somit nur positive PCR-Amplifikate erhalten werden, wenn das mRNA-Transkript auch tatsächlich in der ursprünglichen mRNA-Isolierung vorhanden war und in cDNA umgeschrieben wurde. In den folgenden Erläuterungen werden die Amplifikate der PCRs deshalb zum besseren Verständnis als "Transkripte" bezeichnet.

Tatsächlich lässt sich eine gemeinsame Transkription mehrerer Gene des *fla*-Clusters finden. Dies war zunächst nicht weiter überraschend, da ja bereits für andere Archaeen eine Kotranskription einzelner *Flagell*ingene gezeigt worden war. Für *P. furiosus* erstreckt sich die Regulation über das *gesamte fl*a-Gencluster. Die Flagellingene werden zusammen mit Genen für die stromabwärts liegenden akzessorischen Proteine transkribiert. Weiterhin konnte für *met* eine gemeinsame Transkription mit den Flagellingenen *flaB0* und *flaB1* gezeigt werden. Das Gen *hth* wird nicht mit *fla*-Genen kotranskribiert, sondern nur im einem separaten Kotranskript zusammen mit *met*.

Die beiden kotranskribierten Gene *hth* und *met* besitzen vermutlich die Funktion von DNA- bzw. Protein-modifizierender und/oder regulierender Enzymen.

Das Helix-turn-helix Motiv stellt ein typisches DNA-bindendes Motiv dar. Es spielt nicht nur für den Transkriptionsapparat als basaler und spezifischer Regulator eine Rolle, sondern auch generell in Enzymen, die an die DNA binden oder auch bei Protein-Protein-Wechselwirkungen. Es wurde diskutiert, dass diesem Motiv wohl auch eine modulierende

²⁷ RT-PCR: Reverse Transkriptase PCR; die RNA wird in DNA umgeschrieben, die dann als cDNA (komplementäre DNA) bezeichnet wird.

Funktion zukommt (Aravind *et al.*, 2005). Da das Gen bzw. das daraus resultierende Protein ein sehr geringes Molekulargewicht (lediglich ca. 12 kDa) aufweist, handelt es sich wahrscheinlich um ein DNA-bindendes Protein. Ob diesem Protein auch eine modulierende Funktion innerhalb des *fla*-Operons zukommt ist natürlich unklar, jedoch könnte die gemeinsame Transkription von *hth* mit *met* darauf hindeuten, da *met* wiederum separat mit den Flagellinen *flaB0* und *flaB1* transkribiert wird.

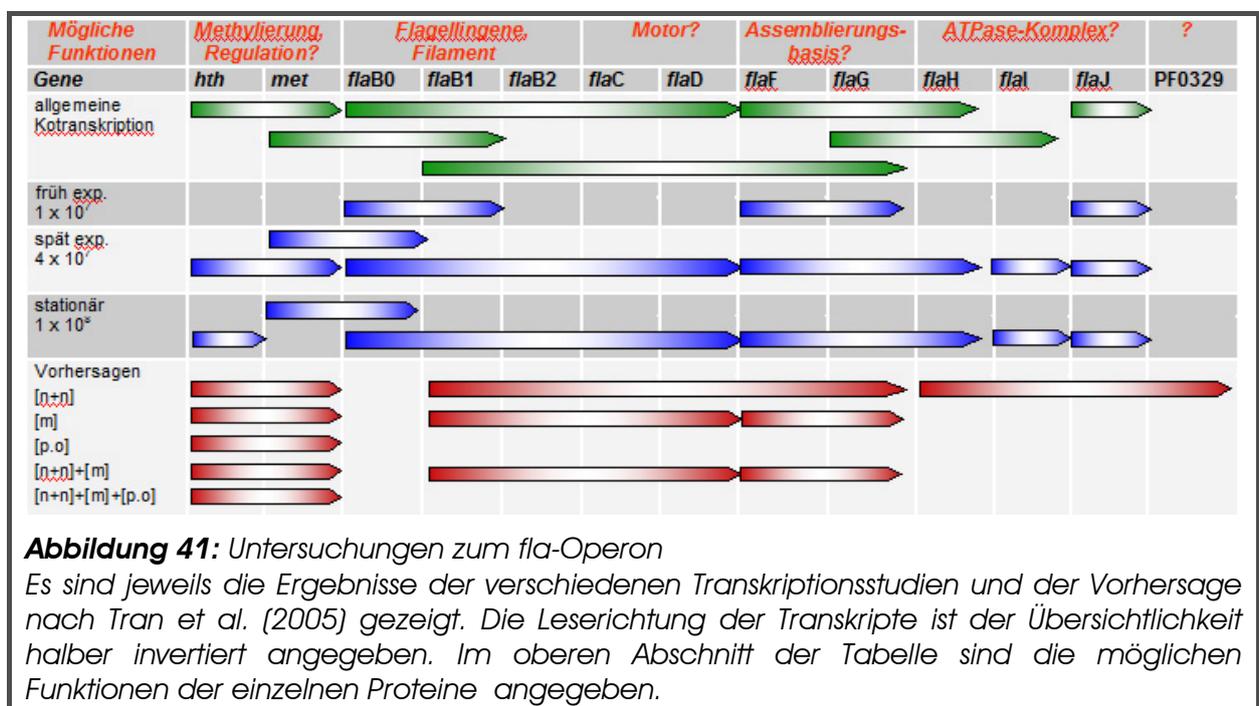
Für das Gen *met* mit der vorausgesagten Funktion als Methyltransferase können mehrere mögliche Funktionen diskutiert werden. Zunächst wäre eine Regulation auf DNA-Ebene mit einer *dam*-Methylase vorstellbar. Für *P. furiosus* konnte jedoch nachgewiesen werden, dass keine GATC-Methylierung durch eine *dam*-Methylase vorliegt (Koike *et al.*, 2005). Dies steht im Gegensatz zur vorhandenen GATC-Methylierung in *P. horikoshii* (Koike *et al.*, 2005).

Somit bleiben folgende Möglichkeiten offen. Es könnte sich um eine neue Form der Regulierung durch Methylierung auf DNA-Ebene handeln. Bislang gibt es nur Ergebnisse durch eine Regulierung durch Methylierung von Cytosinresten, offen bleibt jedoch die Funktion der Methylierung von Adeninresten. Als weitere Regulation wäre die Methylierung von Proteinen vorstellbar. Methylierungen sind von grosser Bedeutung innerhalb der Signalkaskade zur Regulation des Schwimmvorgangs, der Signalrezeption und -adaption. Methylgruppen können an vielen Aminosäurereste angehängt werden, wie z.B. an den Aminogruppen von Alanin, Arginin, Glutamin, Histidin, Lysin, Prolin oder an Hydroxylresten von Glutamin, Asparagin oder an Thiolgruppen von Cysteinen (Eichler *et al.*, 2005). Obwohl überraschenderweise für *P. furiosus* keinerlei *che*-ähnlichen Gene gefunden werden konnten (wiederum im Gegensatz zu *P. abyssi* und *P. horikoshii*) könnte ein bislang nicht charakterisiertes System der Regulation dieser Aufgabe dienen. Aufschlussreich erscheint die Tatsache, dass für Typ IV Pili eine N-verknüpfte Methylierung nachgewiesen wurde. Für die Piline von *Pseudomonas aeruginosa* und *Vibrio cholerae* konnte eine solche Methylierung des aminoterminalen Endes des reifen Pilins gezeigt werden (Strom *et al.*, 1991). Der Grund für diese Methylierung ist bislang nicht geklärt, ein direkter Zusammenhang mit der Initiation der Assemblierung oder der Polymerisation der Piline zu einem Pilus besteht per se nicht. Es wäre jedoch denkbar, dass die Methylierung für die Prozessierung des Präpilins eine wichtige Rolle spielt. Wichtig war in dieser Hinsicht auch, dass nicht alle untersuchten Piline eine N-terminale Methylierung besaßen. Im Fall des untersuchten Flagellins *FlaB0* von *P. furiosus* konnte mit den verwendeten Untersuchungsmethoden keine N-verknüpfte Methylierung des reifen, sezernierten Flagellins am aminoterminalen Adenin nachgewiesen werden. Vorhandene Methylierungen würden sich zudem nicht störend auf die Sequenzierung selbst auswirken (persönl. Mitteilung Prof. Deutzmann).

Ein Zusammenhang der Methyltransferase mit den Fla-Proteinen bleibt also weiterhin spekulativ. Wie bereits diskutiert wurde, wirft Giometti *et al.* (2001) den Gedanken auf, dass es außer der Glykosylierung noch weitere posttranslationale Modifizierungen der Flagellinproteine geben müsse. Diese würden die Diskrepanz im Laufverhalten der Proteine erklären, wie bereits weiter oben erwähnt wurde, wobei hierfür aber sehr viele Methylierungen vorliegen müssten.

Des Weiteren war es natürlich von Interesse, ob unterschiedliche Transkripte an verschiedenen Zeitpunkten der Wachstumsphase vorliegen. Hierfür wurde mRNA aus drei verschiedenen Phasen der Wachstumskurve isoliert: früh und spät exponentiell und schließlich spät stationär. Diese Proben wurden dann wie oben beschrieben in cDNA umgeschrieben und anschließend für die jeweiligen Wachstumsphasen die PCRs mit den verschiedenen Primerkombinationen durchgeführt.

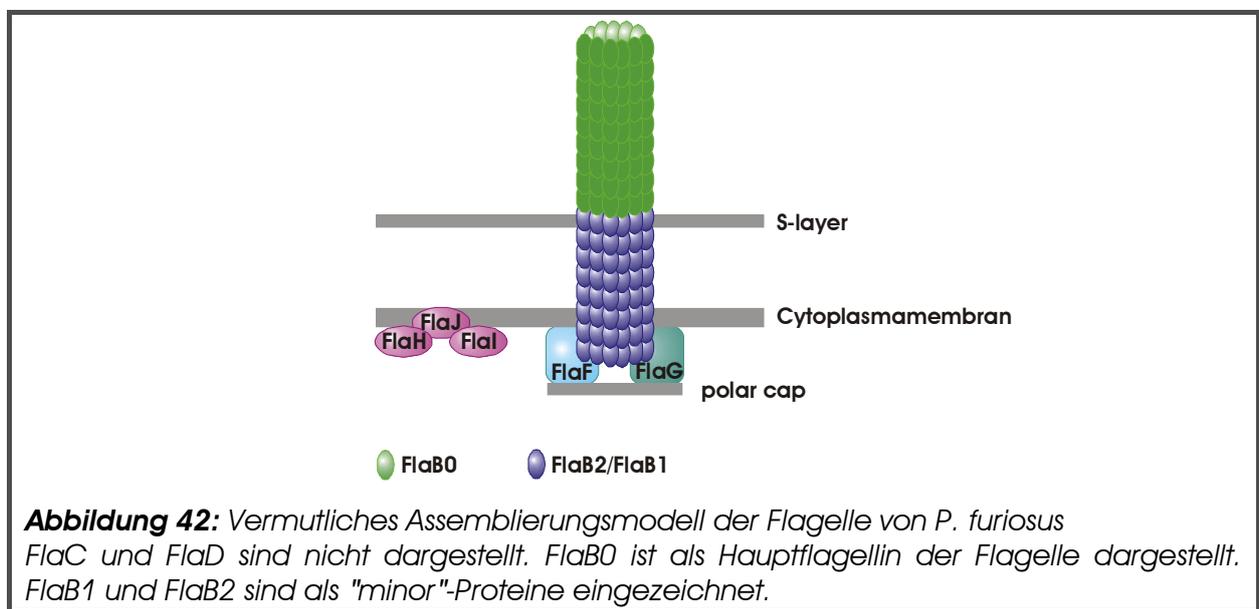
Eine quantitative Aussage über die Menge der gefundenen Transkripte kann mit der verwendeten Methode nicht gemacht werden. Es wurde versucht, die verschiedenen Kotranskripte direkt mittels Hybridisierung mit radioaktiv markierten Sonden nachzuweisen („Northern Blot“). Diese Versuche waren jedoch ohne Erfolg, weshalb zur Auswertung die Ergebnisse der RT-PCRs herangezogen wurden. Auch in diesen Versuchen werden die erhaltenen PCR-Amplifikate als "Transkripte" bezeichnet.



In der Zusammenstellung der Kotranskripte in Abb.41 wird deutlich, dass einige Kotranskripte bzw. Einzeltranskripte erst im Verlauf der Wachstumsphase (also von der früh über die spät exponentielle bis hin zur spät stationären Phase) auftreten. Am Beginn konnten zunächst Kotranskripte von *flaB0/flaB1* und *flaF/flaG* gefunden werden. *FlaJ* liegt als

Einzeltranskript vor. Der Übertritt der spät exponentielle Phase zur späten stationären Phase erweist sich in Hinblick auf die Analyse der (Ko)Transkripte als relativ stabil. Zu beiden Zeitpunkten konnten Kotranskripte von *hth/met*, *met/flaB0*, *flaB0/flaB1/flaB2/flaC/flaD*, *flaF/flaG/flaH* und jeweils Einzeltranskripte *flaI* und *flaJ* gefunden werden. Zur spät stationären Phase verschwindet lediglich das Kotranskript von *hth/met* und *hth* wird nur noch als Einzeltranskript vorgefunden. Diese Ergebnisse verdeutlichen aber, dass es im Verlauf der Wachstumsphase zur (Ko)Transkription verschiedener Gene kommt.

In Abb.42 wurde zum besseren Verständnis der Lokalisation der einzelnen Untereinheiten nochmals der spekulative Aufbau des archaeellen Flagellenapparates nach den bislang bekannten Daten für *P. furiosus* dargestellt. Die Ergebnisse dieser Analysen können mit dem spärliche Hintergrund zu den Funktionen der einzelnen Proteine wie folgt interpretiert werden.



Zunächst werden FlaB0 und FlaB1 zusammen exprimiert. Von FlaB0 wurde bereits gezeigt, dass es sich um das Hauptflagellin der Flagelle handelt (s.o.). Da FlaB1 nicht in der Flagellenpräparation nachgewiesen werden konnte, wurde es als Neben-Flagellin eingestuft. Im Sinne der wahrscheinlich zu den Typ IV Pili vergleichbaren Assemblierung der archaeellen Flagelle würde es also Sinn machen, dass zunächst das Hauptflagellin assembliert wird und erst später Proteine, die als Nebenflagelline oder Verankerungsstruktur dienen. Des Weiteren werden die Proteine FlaF und FlaG miteinander exprimiert. In Abb.42 sind diese als Basis für die Assemblierung der Flagelle angegeben. Für beide Proteine wurde zudem laut Voraussagen eine Membranbindung vorausgesagt. Insofern wäre eine gemeinsame Transkription von *flaF* und *flaG* in einem frühen Stadium des Wachstums stimmig, wenn diese tatsächlich als Basis zur Assemblierung dienen. Auch FlaJ würde als membranständiges Protein, dem möglicherweise eine Transportfunktion zukommt, benötigt werden.

Zu einem späteren Zeitpunkt werden alle weiteren Komponenten transkribiert, wobei auch hier auffällt, dass es insbesondere zur Kotranskription von funktionellen Einheiten kommt. Dies gilt insbesondere für die Flagellengene *flaB0*, *flaB1* und *flaB2*, welche die Flagelle aufbauen. Da für *flaC* und *flaD* keinerlei Funktionen bekannt sind, kann nur spekuliert werden, weshalb sie mit den Flagellinen kotranskribiert werden. Möglicherweise könnte es sich aber ebenfalls um eine basale Struktur zur Verankerung oder Motorkomponenten handeln, die erst zu einem späteren Zeitpunkt exprimiert werden müssen. Für die Proteine FlaH, FlaI und FlaJ wurde bereits oben aufgezeigt, dass es sich möglicherweise um eine Art ATPase-Komplex oder auch "Minimalassemblierungskomplex" handelt. FlaJ als mögliches Membranprotein wird wohl schon zu Beginn benötigt, da das Transkript in allen drei Wachstumsphasen gefunden werden konnte. Alle drei Komponenten liegen laut Voraussagen innerhalb der Membran (FlaH, FlaJ) oder membranassoziiert vor (FlaI). Falls die Proteine der Gene *hth* und *met* für Regulationen oder generelle Funktionen (Methylierungen etc.) innerhalb des *fla*-Operons benötigt werden, so erst zu einem späteren Zeitpunkt, da diese erst ab der späten exponentiellen Phase exprimiert werden.

Die Rolle des Genes PF0329 bzw. des dadurch kodierten Proteines konnte nicht aufgeklärt werden. Das Protein wird zu keinem der untersuchten Zeitpunkte mit Genen des *fla*-Clusters kotranskribiert. Auch Einzeltranskripte von PF0329 konnten nicht nachgewiesen werden.

Die Untersuchung der Kotranskription konnte einen kleinen Bereich des Assemblierungsprozesses der archaellen Flagelle beleuchten und dabei die bislang aufgestellten Vermutungen bestätigen. Es wird deutlich, dass es im Verlauf der Wachstumsphase zur gemeinsamen Transkription funktioneller Einheiten kommt, die wohl konzertiert zu verschiedenen Zeitpunkten des Flagellenaufbaus benötigt werden. Das *fla*-Cluster kann also mit Berechtigung als *fla*-Operon²⁸ bezeichnet werden, wobei zur genaueren, quantitativen Charakterisierung noch weitere Untersuchungen folgen müssen.

Im Rahmen dieser Arbeit konnten übergreifende Erkenntnisse über die Interaktion von Archaeen gewonnen werden. Abschließend bleibt festzustellen, dass die archaelle Flagelle von *P. furiosus* als multifunktionelles Organell dient. Eine Struktur, die an sich schon für die faszinierende Eigenschaft der Motilität zuständig ist, bietet noch mehr Funktionen, wie die gezielte Anheftung an Oberflächen und die Ausbildung von Zell-Zell-Kontakten. Im Hinblick auf mögliche (bio)technologischen Anwendungen wurde das Flagellin-Protein patentiert. In den letzten Jahren finden sich immer häufiger Verbindungen von natürlichen Strukturen innerhalb der Nano(bio)technologie mit technischen Anwendungen, so dass wohl auch dieses thermostabile Protein eine Verwendung als eine Art „Biokleber“ finden könnte.

²⁸ Ein Operon definiert sich in der Bakteriengenetik traditionell durch gemeinsame bzw. koordiniert exprimierte Gene.

V. Zusammenfassung

Bei *Pyrococcus furiosus*, der *rasenden Feuerkugel*, handelt es sich um ein motiles Archaeum. Die bis zu 50 Flagellen, die pro Zelle vorliegen können, wurden mit der Motilität in Verbindung gebracht. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Flagellen von *P. furiosus* als ein multifunktionelles Organell dienen können, welche nicht nur die Fähigkeit zum Schwimmen verleihen. Die Flagellen sind für eine bislang einzigartige Vernetzung einzelner Zellen untereinander, aber auch in größeren Ansammlungen von Zellen verantwortlich. Dies führt letztendlich zur Ausbildung eines Biofilms. Die neuartige Verbindung zwischen den Zellen wird dabei von dem Flagellenbüschel einer Zelle hergestellt, wobei das gesamte Büschel an einer zweiten Zelle inseriert und die Zellen somit verbunden werden.

Die Flagellen weisen zudem die Fähigkeit zur Anheftung an verschiedensten Oberflächen auf. Die Anheftung geschieht dabei selektiv, wobei es zur Bevorzugung oder Diskriminierung von Oberflächen kommen kann. Die getesteten Materialien (=Oberflächen) wurden dabei breit gefächert ausgewählt, auch im Hinblick auf eine mögliche industrielle Nutzung der Flagellinproteine innerhalb der Nano(bio)technologie als neuartigen, hitzestabilen „Biokleber“.

Des Weiteren wurde eine systematische und detaillierte Studie zum Verlauf der Transkription des *fla*-Genclusters von *P. furiosus* erstellt. Die archaeele Flagelle wird vermutlich ähnlich dem Mechanismus der bakteriellen Typ IV Pili von der Basis her assembliert, was einen Gegensatz zur Assemblierung der bakteriellen Geißel darstellt. Diese bereits lange bestehende Hypothese wird durch die durchgeführten Untersuchungen der (Ko)Transkriptionsmuster der Gene innerhalb dieses *fla*-Genclusters unterstützt. Es konnte gezeigt werden, dass es im Verlauf der Wachstumskurve zu unterschiedlichen Transkriptionsmustern kommt. Es findet eine zeitnahe Kotranskription der wohl jeweils benötigten Komponenten zum Aufbau der Flagelle statt. Zunächst kommt es am Beginn der Wachstumskurve vorwiegend zur Expression des Hauptflagellins, welches für die Assemblierung des Hauptanteils der Flagelle benötigt wird. Weiterhin werden Proteine gefunden, die als membranständige bzw. membranassoziierte Proteine vermutlich als Assemblierungsbasis des Filaments und für den Transportmechanismus über die Membran dienen könnten. Im weiteren Verlauf der Wachstumskurve werden alle weiteren Komponenten transkribiert, die wohl für die Assemblierung der Nebenflagelline oder möglicherweise des Antriebs benötigt werden. Es konnte gezeigt werden, dass es nicht nur zur (Ko)Transkription von *fla*-Genen kommt. Einen weiteren neuen Aspekt stellt die Kotranskription der *fla*-Gene mit weiteren stromabwärts gelegenen Genen dar. Diese Proteine dienen vermutlich der Modifizierung einzelner Fla-Proteine bzw. der Regulation der Transkription.

VI. Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Bedeutung	Abkürzung	Bedeutung
Abb.	Abbildung	NK	Negativkontrolle
abs.	absolut	Nr.	Nummer
ad	zu	OD	Optische Dichte
al.	alii	opt.	optional
APS	Ammoniumperoxidsulfat	p.a.	zur Analyse
bidest	zweifach destilliert	PAS	Periodat-Schiff
bp	Basenpaare	PCR	polymerase chain reaction (Polymerase-Ketten-Reaktion)
bzw.	beziehungsweise	pers. Mitteilung	persönliche Mitteilung
ca.	circa	pH	pondus hydrogenii (negativer, dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionenkonzentration)
cDNA	komplementärer DNA-Strang	PK	Positivkontrolle
dATP	Desoxyadenosin-5'-triphosphat	PVDF	Polyvinylidenfluorid
dCTP	Desoxycytidin-5'-triphosphat	r	rückwärts
dGTP	Desoxyguanosin-5'-triphosphat	RNA	Ribonukleinsäure
DMSO	Dimethylsulfoxid	mRNA	messenger-RNA („Boten-RNA“)
DNA	Desoxyribonukleinsäure	RT	Raumtemperatur
dTTP	Desoxythymidin-5'-triphosphat	RT-PCR	Reverse-Transkription-PCR
dUTP	Desoxyuridin-5'-triphosphat	s	Sekunde
Ed.	Editor(en)	s.	siehe
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure	s.a.	siehe auch
evtl.	eventuell	SDS	Natriumdodecylsulfat
f	vorwärts	s.o.	siehe oben
g	Gramm	sog	sogenannt
ggf.	Gegebenenfalls	spez.	spezifisch
G+C	Guanin+Cytosin	Tab.	Tabelle
h	Stunde	TCA	Trichloressigsäure
HPLC	High Performance Liquid Chromatography	TFA	Trifluoressigsäure
inkl.	inklusive	Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
kDa	kilo-Dalton	üN	über Nacht
l	Liter	Upm	Umdrehungen pro Minute
M	Molar	vgl.	vergleiche
m	Meter	v/v	Volmen pro Volumen
MCP	methylated chemotaxis protein	v/w	Gewicht pro Volumen
mind.	mindestens	z.B.	zum Beispiel
MOPS	4- Morpholinpropansulfonsäure	z.T.	zum Teil

Tabelle 24: Abkürzungsverzeichnis

Code	Aminosäure	Code	Aminosäure
Ala	A	Leu	L
Arg	R	Lys	K
Asn	N	Met	M
Asp	D	Phe	F
Cys	C	Pro	P
Glu	E	Sec	U
Gln	Q	Ser	S
Gly	G	Thr	T
His	H	Trp	W
Ile	I	Tyr	Y
		Val	V

Tabelle 25: IUPAC-Code für Aminosäuren

Code	Nukleotid	Code	Nukleotid
A	Adenin	G	Guanin
C	Cytosin	T	Thymin
		U	Uracil

Tabelle 26: IUPAC-Code für Nucleotide

Symbol	Präfix	Faktor	Symbol	Präfix	Faktor
k	kilo	10^3	n	nano	10^{-9}
c	centi	10^{-2}	p	pico	10^{-12}
m	milli	10^{-3}	f	femto	10^{-15}
μ	mikro	10^{-6}			

Tabelle 27: Präfixe für Einheiten, entsprechendes Symbol und Faktor

VII. Anhang

1. Sequenzalignments der Fla-Proteine von *P. furiosus*

Das mittels HPLC bzw. MALDI-TOF ermittelte Peptid (Sequenz 2) passt nur zu FlaB0. Analysen mit ClustalW.

Sequenzidentitäten: schwarz hinterlegt (*); konservative Sequenzsubstitutionen: dunkelgrau (:); semi-konservative Sequenzsubstitutionen (.)

FlaB0	MAKKGAVGIGTLIVFIAMVLVAAVAAGVLIQTSGYLQKKSQATGAETTQEVASGIKVLVSVGKTDNSNKTYVEKLA	AIYISP	120
Sequenz 2	-----	AIYISP	6

FlaB0	FNASTAWNLSNTNFGIIVLQDADNSVDQNYPTLNKGDIVVITVKVGEENGVFVGKGI PPRTKITGKVIPEFQAPGVIEFTTPSTYTSEVIELQ	212
Sequenz 2	-----	

FlaB1	VRKGAIGIGTLIVFIAMVLVAAVAAGVLIIGTAGYLQKKAQAAGRQTTQEVASGIKIVNVFGYINATPPSNGTIVKMA	TFVTP	120
Sequenz 2	-----	AIYISP	6
		**:::*	

FlaB1	LFNLPVWNTKNGTFSIAVVNDVGSKMEDTHPTLEWGDVALLRRTDDVFNYKSKNGIGPSTRIIGKVIPDAGAAGVIDFTTPPTFEYNVIELQ	214
Sequenz 2	-----	

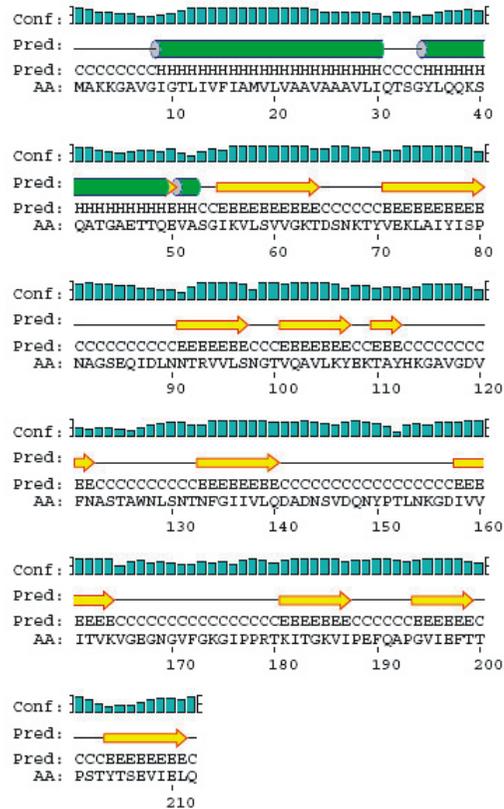
FlaB2	MKKGAVGIGTLIVFIAMVLVAAVAAGVLIATSGYLQKAMATGRQTTQEVASGIKVTGVFGYINGTTPPGASNISRI	VIVVA	120
Sequenz 2	-----	AIYISP	6
		.**::*	

FlaB2	KPEYIHYKGDIPNIFAYGEWEPYKKNKPKQISGEYITDNINVSAVWVWNLAYSAYNNSKLLFGIAVVQDGDNSLSDPQHPTLSWGDLAALMIWTFPFDDNNISNGFGLRPGTKIIGKVIP	240
Sequenz 2	-----	

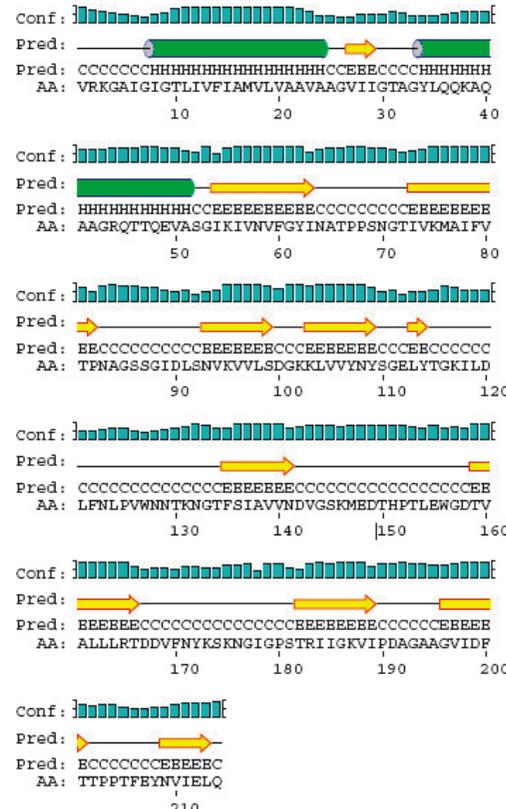
FlaB2	ESGAAGVIDFTTPSTYTQNLMEIQ	264
Sequenz 2	-----	

2. Sekundärstrukturanalysen der Strukturflagelline von *P. furiosus* (PredictProtein ; Rost, 2005)

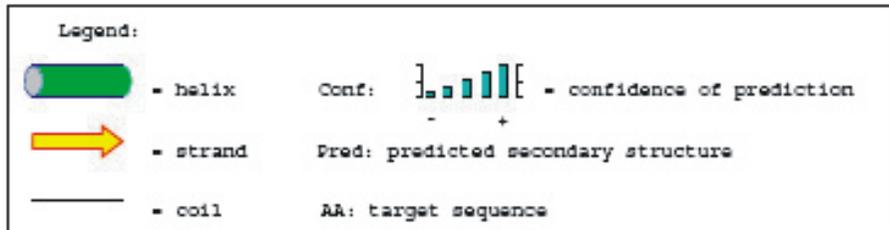
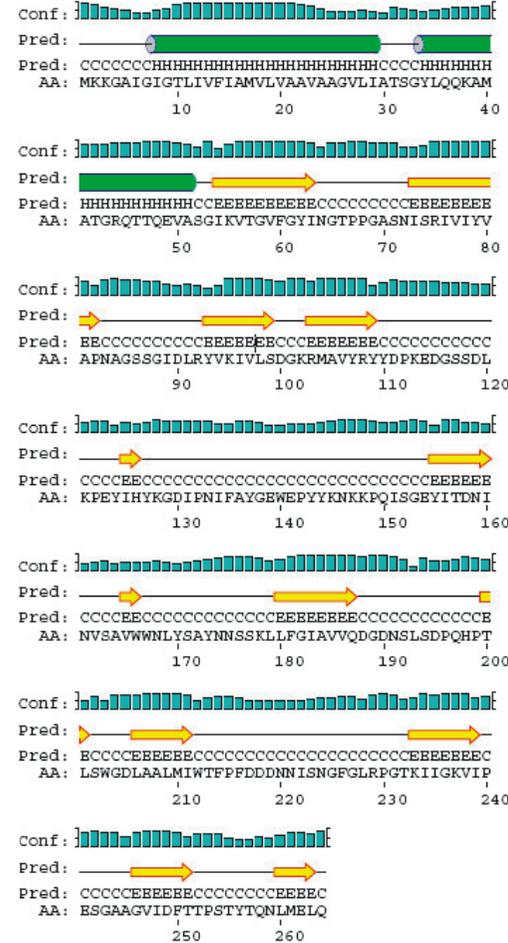
FlaB0



FlaB1

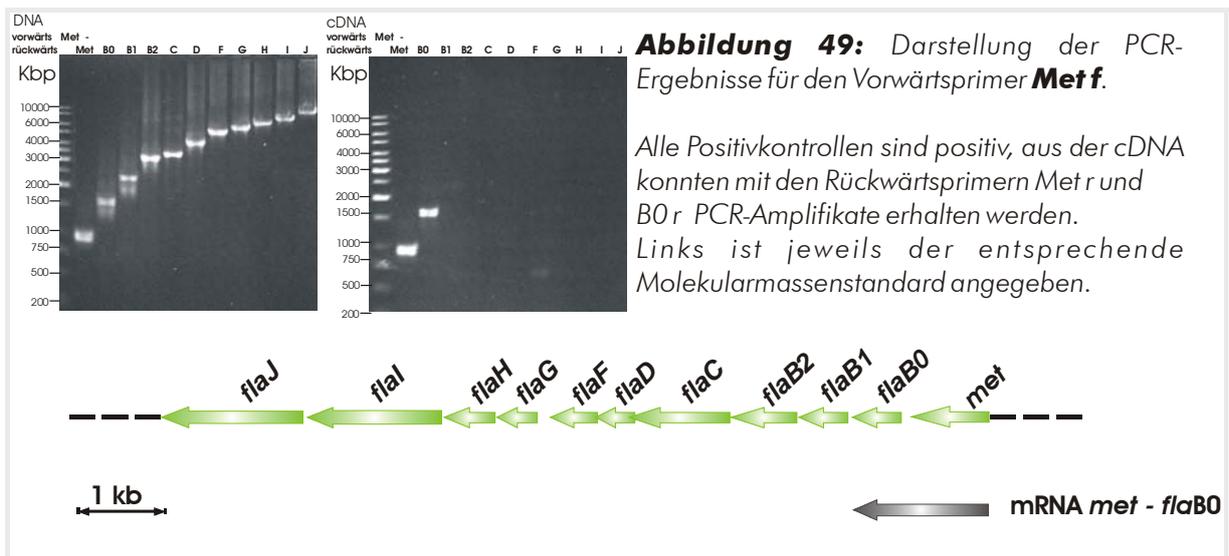


FlaB2



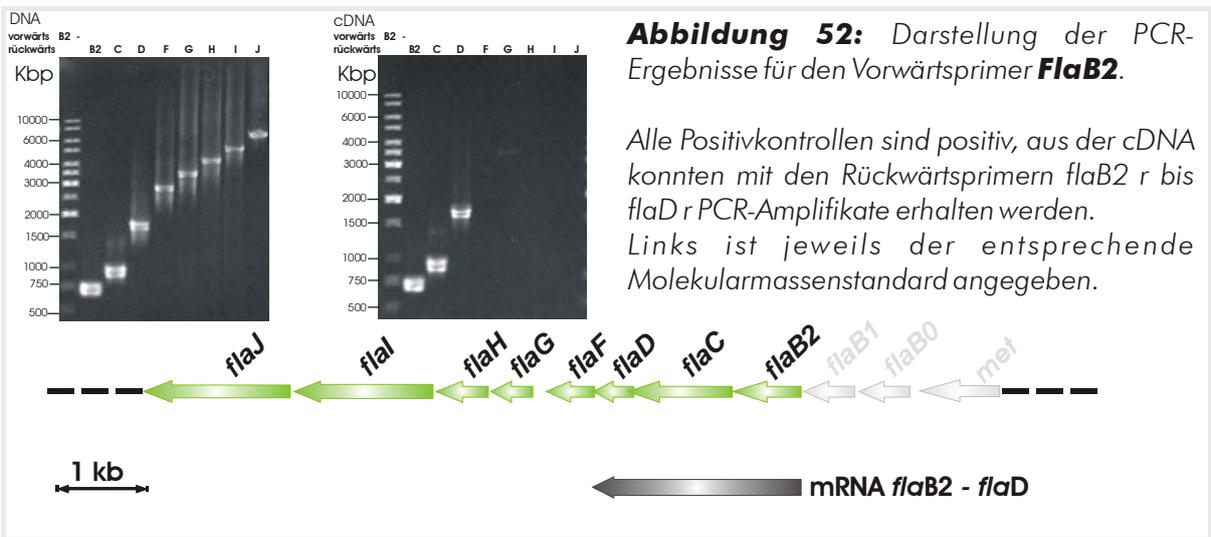
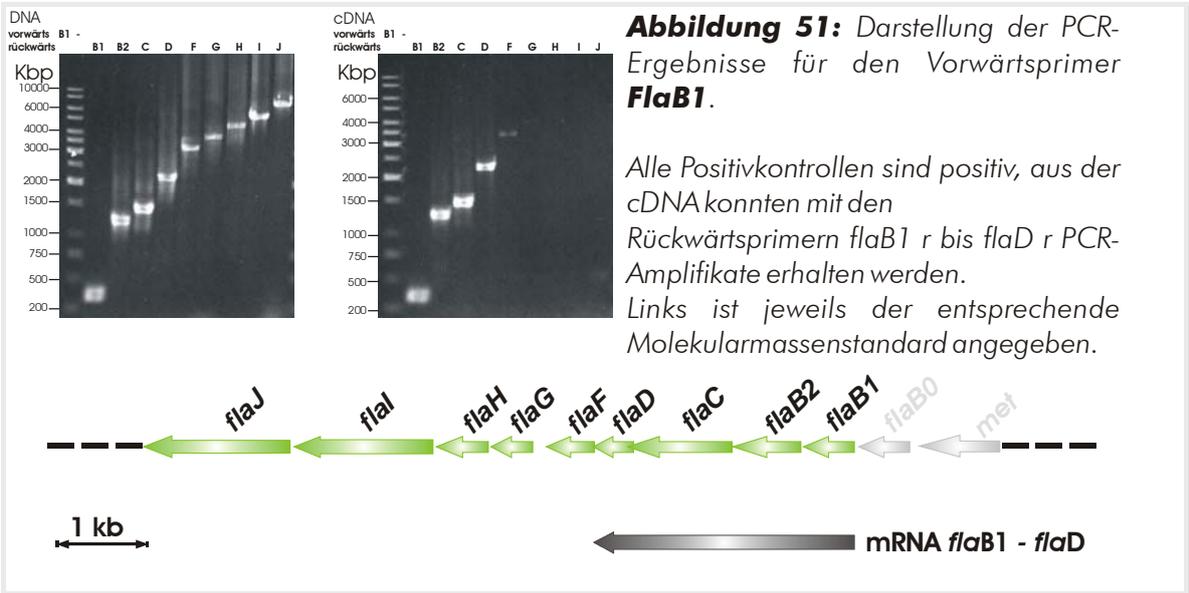
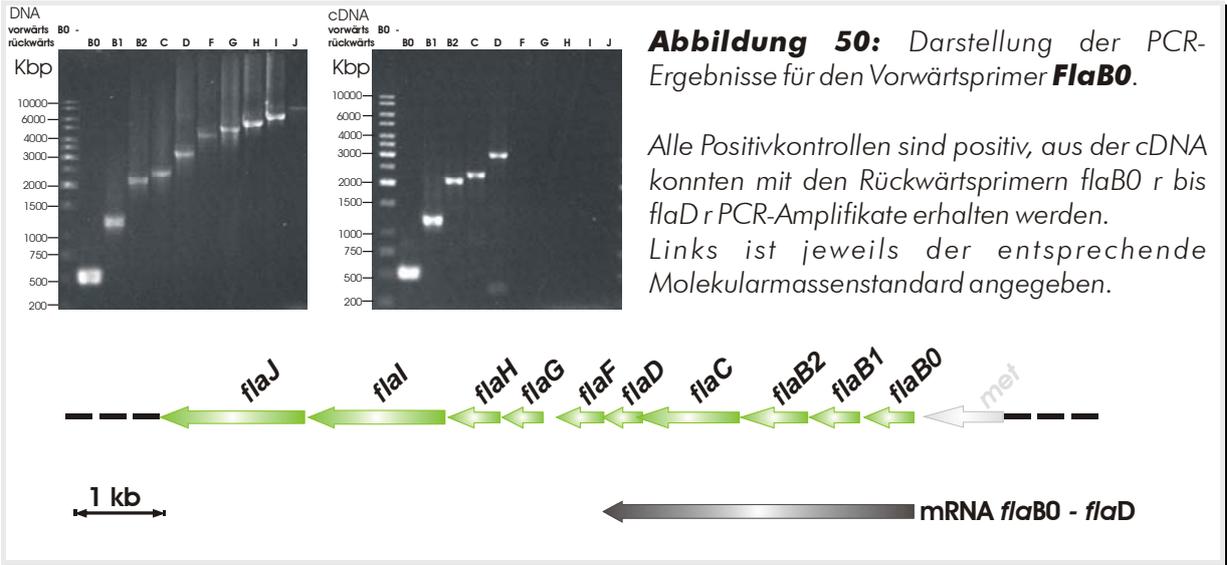
4. Das Operon

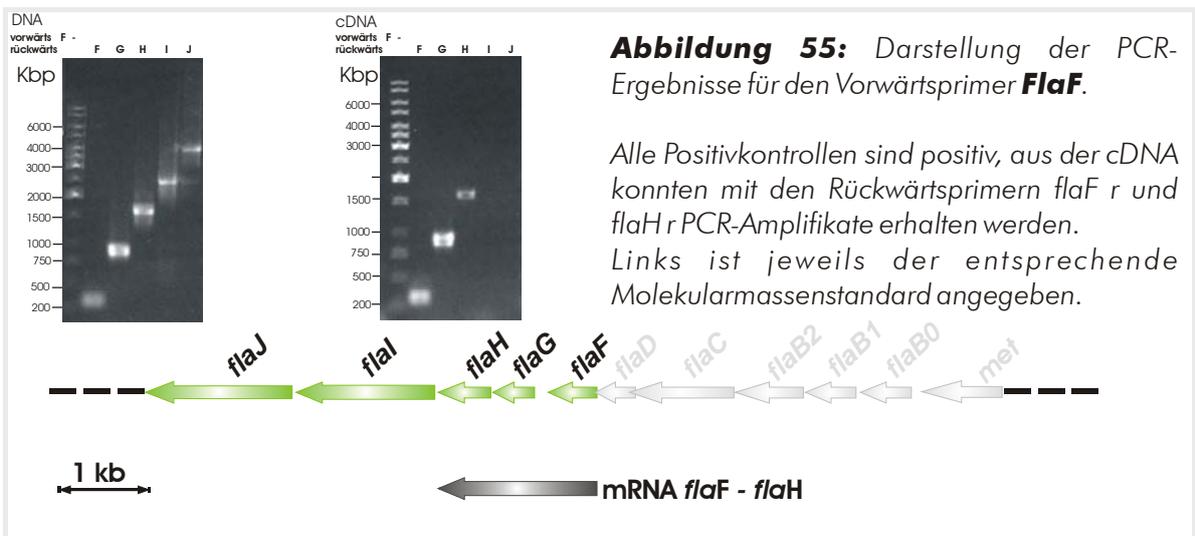
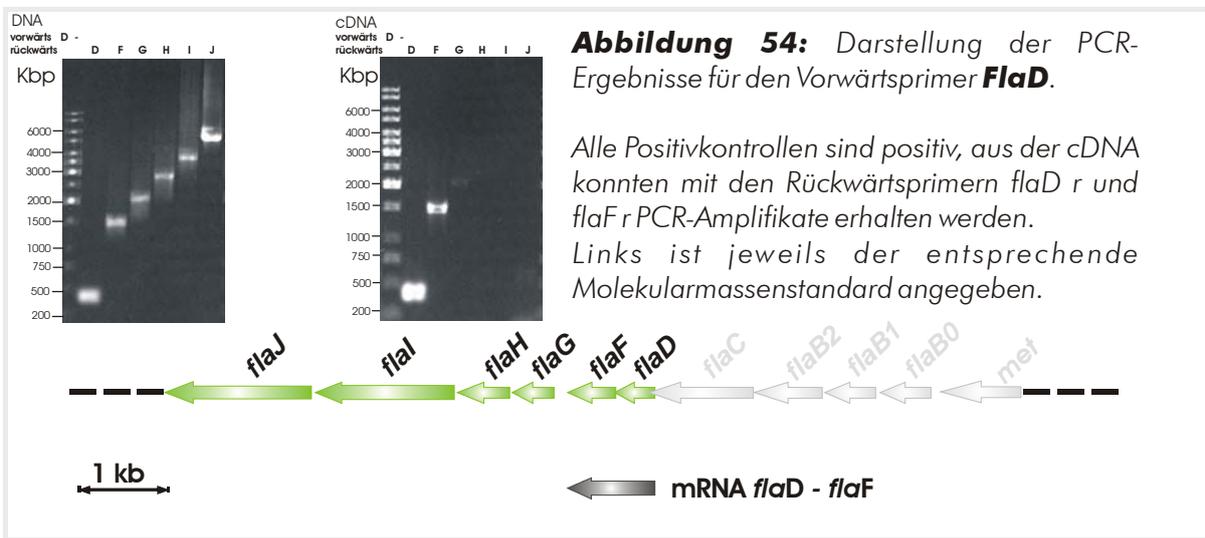
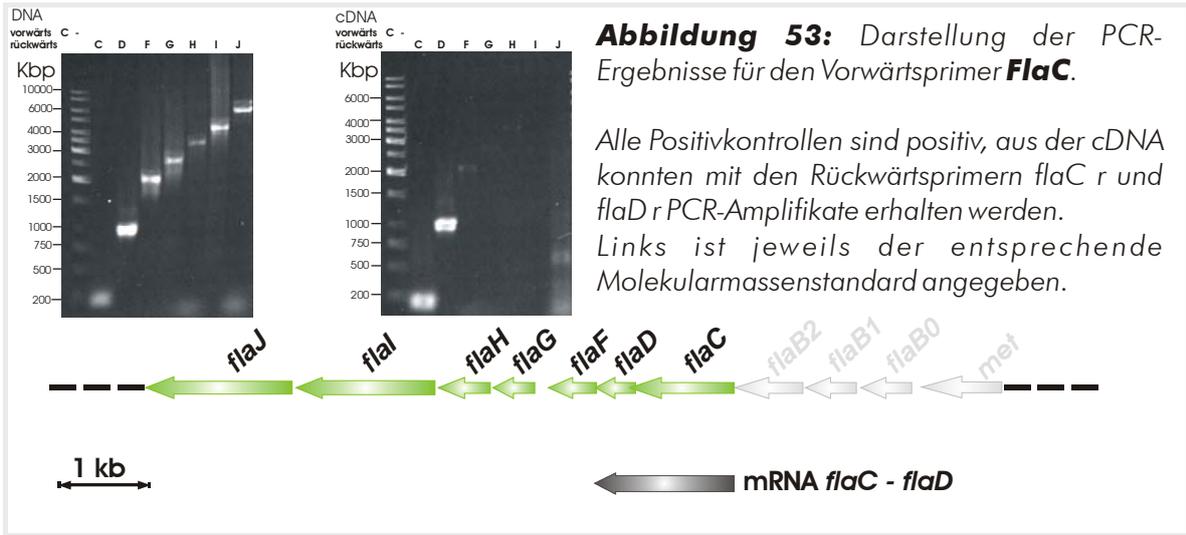
In den folgenden Abbildungen sind die jeweiligen PCR-Amplifikate dargestellt. Ausgehend von einem Vorwärtsprimer, laufen die gezeigten Transkripte durch die immer weiter stromabwärts liegenden Rückwärtsprimer bei immer größeren Molekularmassen im Agarosegel. Im linken Teil der Abbildung sind die jeweiligen Positivkontrollen aus DNA aufgeführt, im rechten Teil die Amplifikate, die aus den Experimenten unter Verwendung der cDNA generiert werden konnten. Primernamen wurden der Übersichtlichkeit halber abgekürzt²⁹. Die jeweiligen Größen entsprechen dabei nicht den exakten Größen der (möglicherweise) vorhandenen Transkripte, sondern den Größen, die durch die Verwendung des jeweiligen Primerpaares vorgegeben werden. Es wurde zur besseren Orientierung jeweils das Modell des Operons angegeben und der untersuchte Bereich farblich gestaltet. Das tatsächlich erhaltene Amplifikat wurde darunter dargestellt (in diesem Fall als mRNA bezeichnet, obwohl der Nachweis aus der umgeschriebenen cDNA erfolgte). Die Ergebnisse für die Experimente mit Hth f und PF0329 f sind nicht gezeigt.

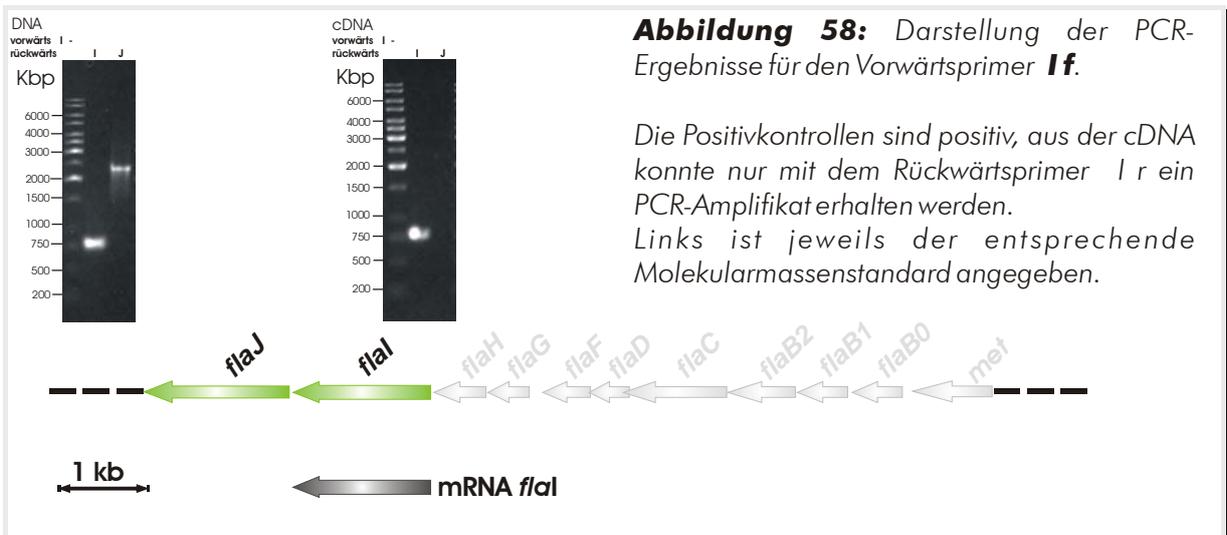
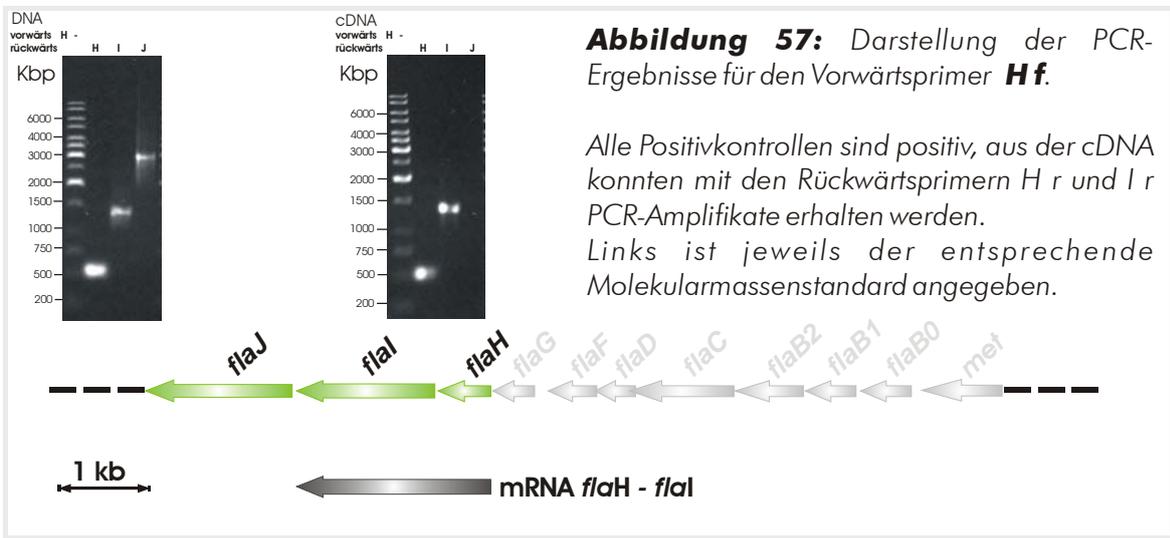
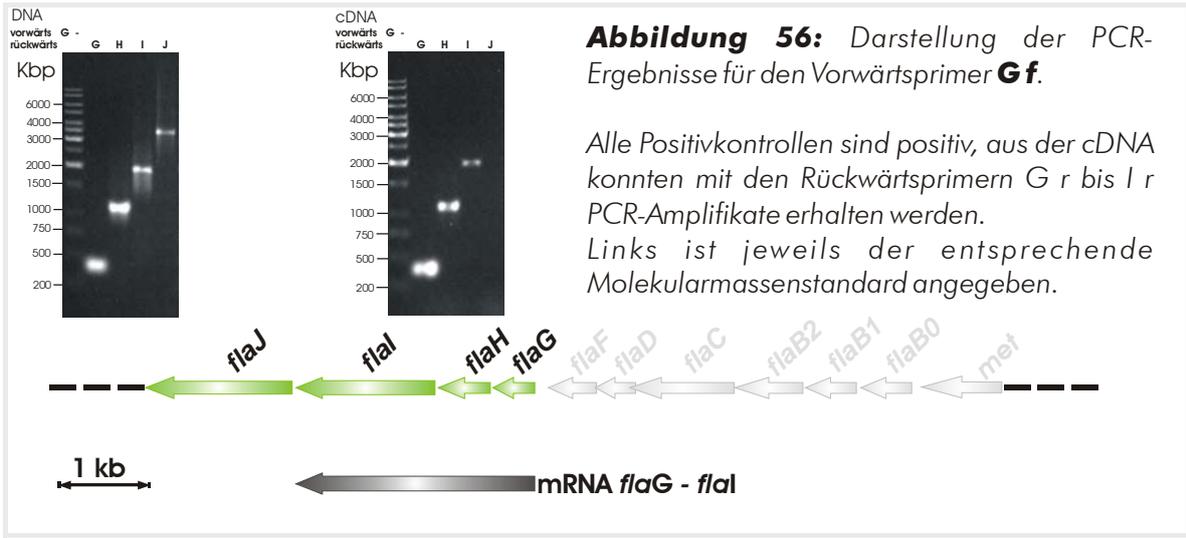


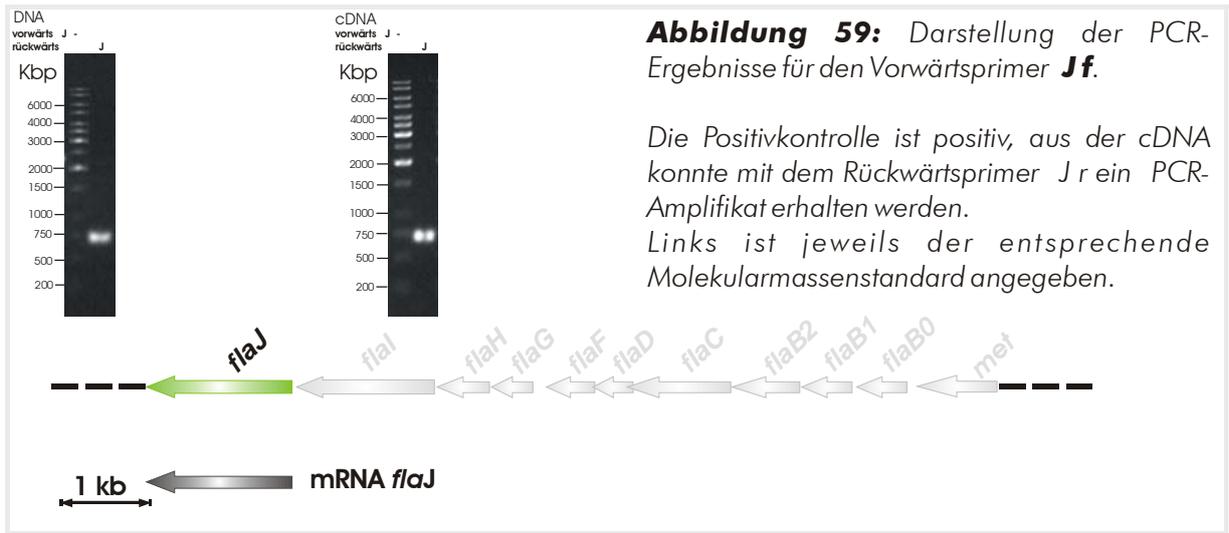
²⁹ Primerabkürzungen:

Met f/r: Methyltransferase vorwärts/rückwärts; B0 f/r: Fla B0 vorwärts/rückwärts; B1 f/r: Fla B1 vorw./rückw.; B2 f/r: Fla B2 vorw./rückw.; C f/r: Fla C vorw./rückw.; D f/r: Fla D vorw./rückw.; F f/r: Fla F vorw./rückw.; G f/r: Fla G vorw./rückw.; H f/r: Fla H vorw./rückw.; I f/r: Fla I vorw./rückw.; J f/r: Fla J vorw./rückw..

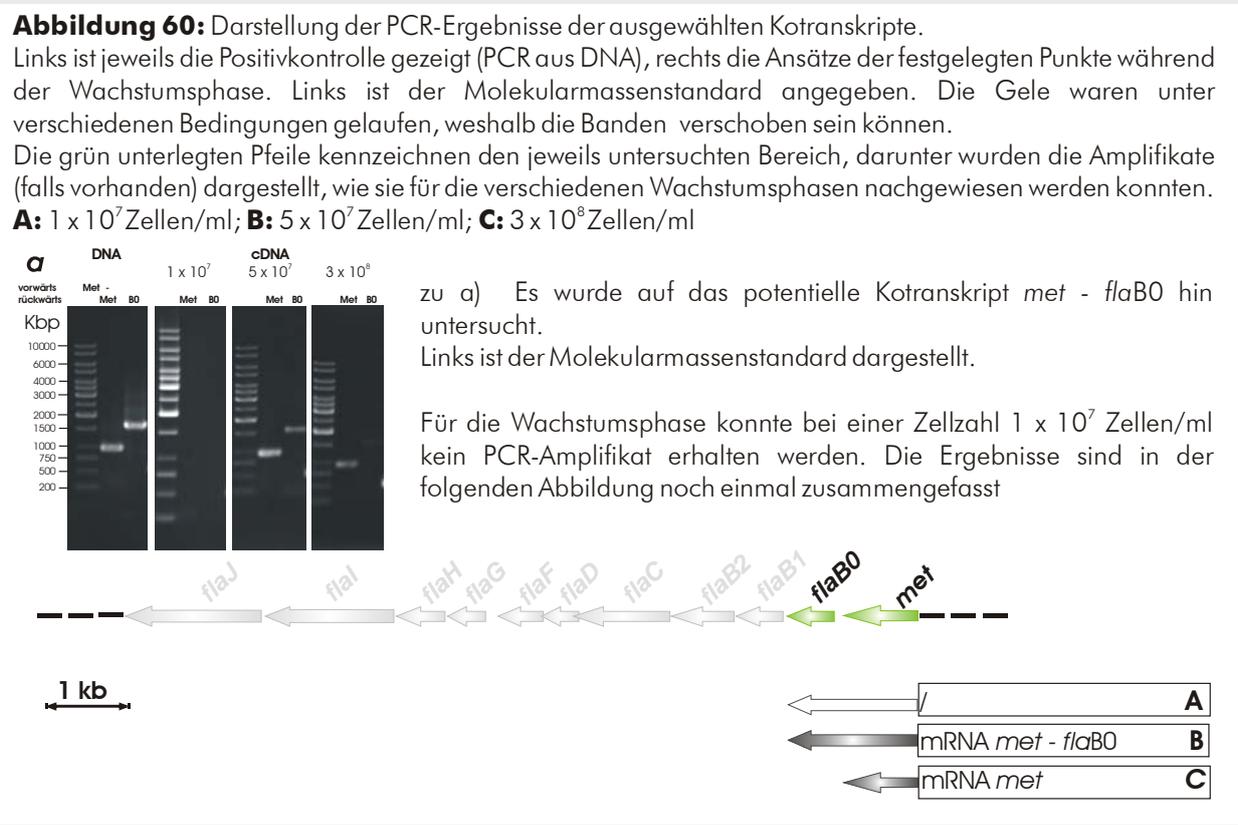


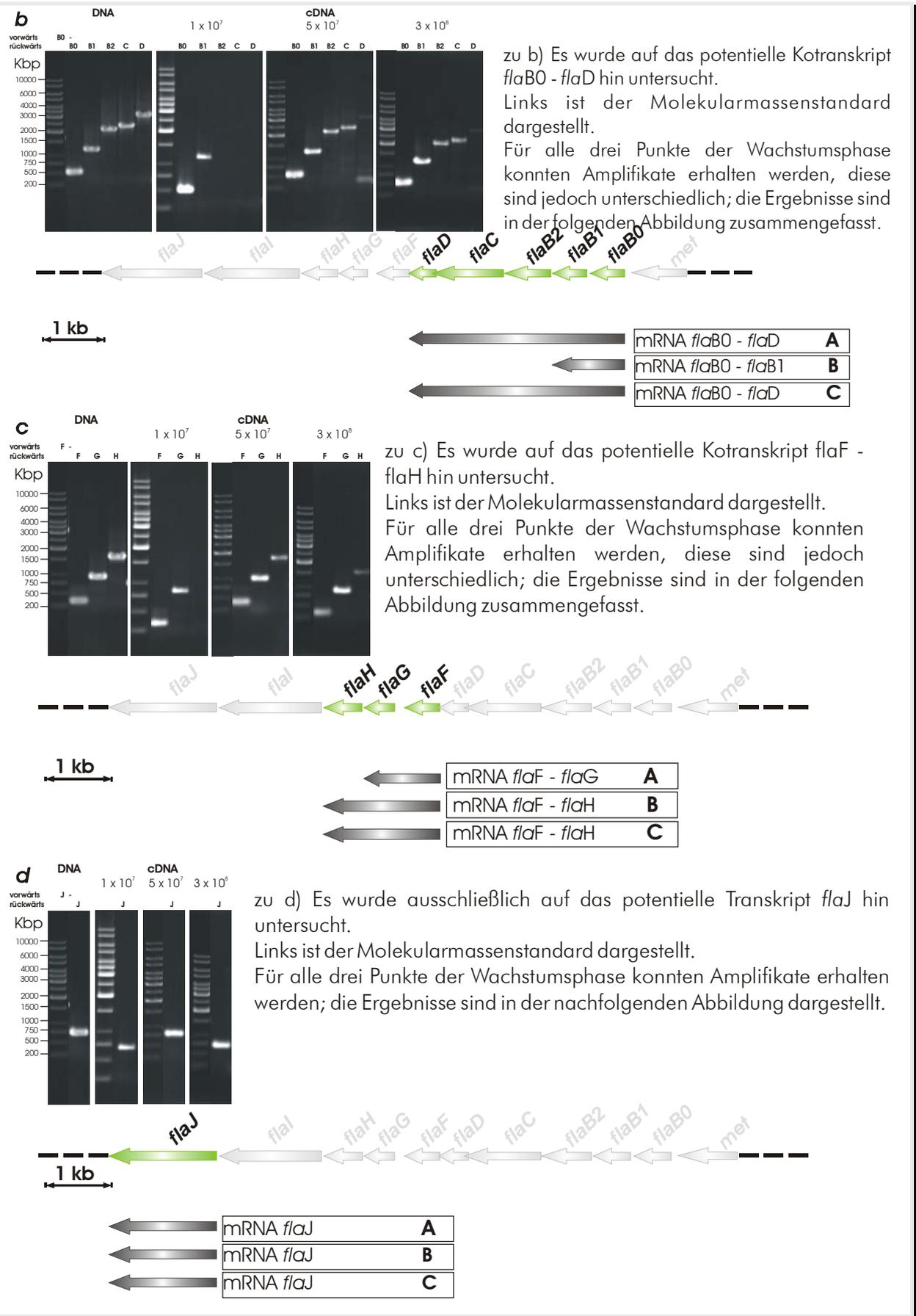






Nachfolgend sind die Ergebnisse für die Untersuchung der verschiedenen (Ko)Transkripte im Verlauf der Wachstumskurve dargestellt. Es sind einige ausgewählte Kotranskripte dargestellt.





VIII. Literaturverzeichnis

- Adler, J., 1973, A method for measuring chemotaxis and use of the method to determine optimum conditions for chemotaxis by *Escherichia coli*. *Journal of General Microbiology*, v. **74**, p. 77-91.
- Alam, M. and Oesterhelt, D., 1984, Morphology, Function and Isolation of Halobacterial Flagella. *Journal of Molecular Biology*, v. **176**, p. 459-475.
- Alam, M., Claviez, M., Oesterhelt, D., and Kessel, M., 1984, Flagella and motility behaviour of square bacteria. *EMBO Journal*, v. **3**, p. 2899-2903.
- Albers S.V. and Driessen, A. J. M., 2005, Analysis of ATPases of putative secretion operons in the thermoacidophilic archaeon *Sulfolobus solfataricus*. *Microbiology*, v. **151**, p. 763-773.
- Albers, S. V., Szabo, Z., and Driessen, A. J. M., 2003, Archaeal Homolog of Bacterial Type IV Prepilin Signal Peptidases with Broad Substrate Specificity. *Journal of Bacteriology*, v. **185**, p. 3918-3925.
- Allen, G., 1989, Sequencing of proteins and peptides. In: *Laboratory techniques in biochemistry and molecular biology*. Eds: Burdon, R., Knippenberger, P.; Elsevier.
- Allers, T. and Mevarech, M., 2005, Archaeal genetics-the third way. *Nature Review Genetics*, v. **6**, p. 58-73.
- Aravind, L. and Koonin, E. V., 1999, DNA-binding proteins and evolution of transcription regulation in the archaea. *Nucleic Acids Research*, v. **27**, p. 4658-2670.
- Aravind, L., Anantharaman, V., Balaji, S., Babu, M. M., and Iyer, L., 2005, The many faces of the helix-turn-helix domain: Transcription regulation and beyond. *FEMS Microbiology Reviews*, v. **29**, p. 231-262.
- Barbosa, M. S., Bao, S. N., Andreotti, P. F., de Faria, F. P., Felipe, M. S. S., dos Santos Feitos, L., Mendes-Giannini, M. J. S., and de Almeida Soares, C. M., 2006, Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase of *Paracoccidioides brasiliensis* Is a Cell Surface Protein Involved in Fungal Adhesion to Extracellular Matrix Proteins and Interaction with Cells. *Infection and Immunity*, v. **74**, p. 382-389.
- Bardy, S. L., Mori, T., Komoriya, K., Aizawa, S., and Jarrell, K. F., 2002a, Identification and Localization of Flagellins FlaA and FlaB within Flagella of *Methanococcus voltae*: *Journal of Bacteriology*, v. **184**, p. 5223-5233.
- Bardy, S. L. and Jarrell, K. F., 2002b, FlaK of the archaeon *Methanococcus maripaludis* possesses preflagellin peptidase activity. *FEMS Microbiology Letters*, v. **208**, p. 53-59.
- Bardy, S. L. and Jarrell, K. F., 2003a, Cleavage of preflagellins by an aspartic acid signal peptidase is essential for flagellation in the archaeon *Methanococcus voltae*. *Molecular Microbiology*, v. **50**, p. 1339-1347.
- Bardy, S. L., Ng, S. Y. M., and Jarrell, K. F., 2003b, Prokaryotic motility structures. *Microbiology*, v. **149**, p. 295-304.

- Bardy, S. L., Ng, S. Y. M., and Jarrell, K. F., 2004, Recent Advances in the Structure and Assembly of the Archaeal Flagellum. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology*, v. 7, p. 41-51.
- Baumeister, W., 2002, Electron tomography: towards visualizing the molecular organization of the cytoplasm. *Current Opinion in Structural Biology*, v. 12, p. 679-684.
- Bayley, D. P., Kalmokoff, M. L., and Jarrell, K. F., 1993, Effect of bacitracin on flagellar assembly and presumed glycosylation of the flagellins of *Methanococcus deltae*. *Archives of Microbiology*, v. 160, p. 179-185.
- Bayley, D. P. and Jarrell, K. F., 1998, Further Evidence to Suggest That Archaeal Flagella Are Related to Bacterial Type IV Pili. *Journal of Molecular Evolution*, v. 46, p. 370-373.
- Bayley, D. P. and Jarrell, K. F., 1999, Overexpression of *Methanococcus voltae* Flagellin Subunits in *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa*: a Source of Archaeal Preflagellin. *Journal of Bacteriology*, v. 181, p. 4146-4153.
- Benbouzid-Rollet, N., Lopez-Garcia, P., Watrin, L., Erauso, G., Prieur, D., and Forterre, P., 1997, Isolation of new plasmids from hyperthermophilic archaea of the order *Thermococcales*. *Research in Microbiology*, v. 148, p. 767-775.
- Bendtsen, J. D., Nielsen, H., von Heinje, G., and Brunak, S., 2004, Improved prediction of signal peptides: SignalP 3.0. *Journal of Molecular Biology*, v. 340, p. 783-795.
- Berg, H. C. and Anderson, R. A., 1973, Bacteria swim by rotating their flagellar filaments. *Nature (London)*, v. 245, p. 380-382.
- Berger, B., Wilson, D. B., Wolf, E., Tonchev, T., Milla, M., and Kim, P. S., 1995, Predicting Coiled Coils by Use of Pairwise Residue Correlations. *Proceedings of the National Academy of Science USA*, v. 92, p. 8259-8263.
- Black, F. T., Freund, E. A., Vinther, O., and Christiansen, C., 1979, Flagellation and swimming motility of *Thermoplasma acidophilum*. *Journal of Bacteriology*, v. 137, p. 456-460.
- Blum, H., Beier, H., and Gross, H. J., 1987, Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels. *Electrophoresis*, v. 8, p. 93-99.
- Bradley, D. E., 1980, A function of *Pseudomonas aeruginosa* PAO polar pili: twitching motility. *Canadian Journal of Microbiology*, v. 26, p. 146-154.
- Brassard, J., Gottschalk, M., and Quessy, S., 2004, Cloning and purification of the *Streptococcus suis* serotype 2 glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase and its involvement as an adhesin. *Veterinary Microbiology*, v. 102, p. 87-94.
- Carbonelle, E., Herlaine, S., Prouvensier, L., Nassif, X., and Pelicic, V., 2005, Type IV pilus biogenesis in *Neisseria meningitidis*: PilW is involved in a step occurring after pilus assembly, essential for pilus assembly and stability. *Molecular Microbiology*, v. 55, p. 54-64.
- Chaban, B., Ng, S. Y. M., Kanbe, M., Saltzman, I., Nimmo, G., Aizawa, S., and Jarrell, K. F., 2006, 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*. *Molecular Microbiology*. [doi:10.1111/j.1365-2958.2007.05913.x]
- Christensen, B. E., 1989, The role of extracellular polysaccharides in biofilms. *Journal of Biotechnology*, v. 10, p. 181-202.
- Cohen-Krausz, S. and Trachtenberg, S., 2002, The Structure of the Archeobacterial Flagellar Filament of the Extreme Halophile *Halobacterium salinarum* R1M1 and Its Relation to Eubacterial Flagellar Filaments and Type IV Pili. *Journal of Molecular Biology*, v. 321, p. 383-395.
- Correia, J. D. and Jarrell, K. F., 2000, Posttranslational Processing of *Methanococcus voltae* Preflagellin by Preflagellin Peptidases of *M. voltae* and Other Methanogens. *Journal of Bacteriology*, v. 182, p. 855-858.
- Crowther, L. J., Anantha, R. P., and Donnenberg, M. S., 2004, The inner membrane subassembly of the enteropathogenic *Escherichia coli* bundle-forming pilus machine. *Molecular Microbiology*, v. 52, p. 67-79.
- Cruden, D., Sparling, R., and Markovetz, A. J., 1989, Isolation and Ultrastructure of the Flagella of *Methanococcus thermolithotrophicus* and *Methanospirillum hungatei*. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 55, p. 1414-1419.
- Delahay, R. M. and Frankel, G., 2002, Coiled-coil proteins associated with type III secretion systems: a versatile domain revisited. *Molecular Microbiology*, v. 45, p. 905-916.
- Denehy, B. V. and Swan, M. A., 1971, Analysis of the tail movement of rotating ram spermatozoa. *Journal of Anatomy*, v. 110, p. 506.
- Desmond, E., Brochier-Armanet, C., and Gribaldo, S., 2007, Phylogenomics of the archaeal flagellum: rare horizontal gene transfer in a unique motility structure: *BMC Evolutionary Biology*, v. 7. [doi:10.1186/1471-2148-7-106]
- Dietl, K., 2006, Untersuchung des Flagellins von *Pyrococcus furiosus*.
- DiRuggiero, J., Dunn, D., Maeder, L., Holley-Shanks, R., Chatard, J., Horlacher, R., Robb, F. T., Boos, W., and Weiss, R. B., 2000, Evidence of recent lateral gene transfer among hyperthermophilic archaea. *Molecular Microbiology*, v. 38, p. 684-693.
- Donlan, R. M., 2002, Biofilms: microbial life on surfaces. *Emerging Infectious Diseases*, v. 8, p. 881-890.
- Dubochet, J., Adrian, M., Chang, J. J., Homo, J. C., Lepault, J., McDowell, A. W., and Schultz, P., 1988, Cryo-electron microscopy of vitrified specimens. *Quarterly Reviews of Biophysics*, v. 21, p. 129-228.
- Ehresmann, B., Imbault, P., and Weil, J. H., 1973, Spectrometric determination of protein concentration in cell extracts containing tRNA's and rRNA's. *Analytical Biochemistry*, v. 54, p. 454-463.

- Eichler, J., 2004, Facing extremes:archaeal surface-layer (glyco)proteins. *Microbiology*, v. **149**, p. 3347-3351.
- Eichler, J. and Adams, M. W. W., 2005, Posttranslational Protein Modification in Archaea. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, v. **69**, p. 393-425.
- Emerson, S. U., Tokuyasu, K., and Simon, M. I., 1970, Bacterial flagella: polarity of elongation. *Science*, v. **169**, p. 190-192.
- Faguy, D. M., Koval, S. F., and Jarrell, K. F., 1992, Correlation between glycosylation and flagellin proteins and sensitivity of flagellar filaments to Triton X-100 in methanogens. *FEMS Microbiology Letters*, v. **90**, p. 45-53.
- Faguy, D. M., Koval, S. F., and Jarrell, K. F., 1993, Effect of changes in mineral composition and growth temperature on filament length and flagellation in the Archaeon *Methanospirillum hungatei*. *Archives of Microbiology*, v. **159**, p. 512-520.
- Faguy, D. M., Koval, S. F., and Jarrell, K. F., 1994a, Physical Characterization of the Flagella and Flagellins from *Methanospirillum hungatei*. *Journal of Bacteriology*, v. **176**, p. 7491-7498.
- Faguy, D. M., Jarrell, K. F., Kuzio, J., and Kalmokoff, M. L., 1994b, Molecular analysis of archaeal flagellins:similarity to the type IV pilin-transport superfamily widespread in bacteria. *Canadian Journal of Microbiology*, v. **40**, p. 67-71.
- Faguy, D. M., Bayley, D. P., Kostyukova, A. S., Thomas, N. A., and Jarrell, K. F., 1996, Isolation and characterization of flagella and flagellin protein from the thermoacidophilic archaea *Thermoplasma volcanium* and *Sulfolobus shibatae*. *Journal of Bacteriology*, v. **178**, p. 902-905.
- Faguy, D. M. and Jarrell, K. F., 1999, A twisted tale: the origin and evolution of motility and chemotaxis in prokaryotes. *Microbiology*, v. **145**, p. 279-281.
- Fedorov, O. V., Pyatibratov, M. G., Kostyukova, A. S., Osina, N. K., and Tarasov, V. Y., 1994, Protofilament as a structural element of flagella of haloalkalophilic archaeobacteria. *Canadian Journal of Microbiology*, v. **40**, p. 45-53.
- Feinberg, A. P. and Vogelstein, B., 1983, A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high activity. *Analytical Biochemistry*, v. **132**, p. 6-13.
- Feinberg, A. P. and Vogelstein, B., 1984, "A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity.". Addendum: *Analytical Biochemistry*, v. **137**, p. 266-267.
- Fiala, G. and Stetter, K. O., 1986, *Pyrococcus furiosus* sp. nov. represents a novel genus of marine heterotrophic archaeobacteria growing optimally at 100°C. *Archives of Microbiology*, v. **146**, 56-61.
- Flemming, H. C. and Wingender, J., 2001, Biofilme - die bevorzugte Lebensform von Bakterien. *Biologie in unserer Zeit*, v. **31**, p. 169-180.

- Flemming, H. C. and Wingender, J., 2002, Proteine, Polysaccharide... Was Biofilme zusammenhält. *Chemie in unserer Zeit*, v. 36, p. 30-42.
- Fletcher, M. and Decho, A. W., 2001, *Biofilms*. London, Nature Publishing Group.
- Forest, K. T., Satyshur, K. A., Worzalla, G. A., Hansen, J. K., and Herdendorf, T. J., 2004, The pilus-retraction protein PilT: ultrastructure of the biological assembly. *Acta Crystallographica Section D*, v. 60, p. 978-982(5).
- Fuchs, T., Huber, H., Teiner, K., Burggraf, S., and Stetter, K. O., 1995, *Metallosphaera prunae*, sp. nov., a novel metal-mobilizing, thermoacidophilic archaeum, isolated from a uranium mine in Germany. *Systematic and Applied Microbiology*, v. 18, p. 560-566.
- Gardy, J. L., Laird, M. R., Chen, F., Rey, S., Walsh, C. J., Ester, M., and Brinkman, F. S. L., 2005, PSORTb v.2.0: expanded prediction of bacterial protein subcellular localization and insights gained from comparative proteome analysis. *Bioinformatics*, v. 21, p. 617-623.
- Gerl, L., Deutzmann, R., and Sumper, M., 1988, Halobacterial flagellins are encoded by a multigene family. *Federation of European Biochemical Societies*, v. 244, p. 137-140.
- Giometti, C. S., Reich, C. I., Tollaksen, S. L., Babnigg, G., Lim, H., III, J. R. Y., and Olsen, G. J., 2001, Structural modifications of *Methanococcus jannaschii* flagellin proteins revealed by proteome analysis. *Proteomics*, v. 1, p. 1033-1042.
- Giron, J. A., Torres, G. A., Freer, E., and Kaper, J. B., 2002, The flagella of enteropathogenic *Escherichia coli* mediate adherence to epithelial cells. *Molecular Microbiology*, v. 44, p. 361-379.
- Hall-Stoodley, L., Costerton, J. W., and Stoodley, P., 2004, Bacterial biofilms: from the natural environment to infectious diseases. *Nature Reviews Microbiology*, v. 2, p. 95-107.
- Hall, T. A., 1999, BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series*, v. 41, p. 95-98.
- Hamilton-Brehm, S. D., Schut, G. J., and Adams, M. W. W., 2005, Metabolic and evolutionary relationships among *Pyrococcus* species: genetic exchange within a hydrothermal vent environment. *Journal of Bacteriology*, v. 187, p. 7492-7499.
- Hegerl, R., 1996, The EM program package: a platform for image processing in biological electron microscopy. *Journal of Structural Biology*, v. 116, p. 30-34.
- Henneberger, R., Moissl, C., Amann, T., Rudolph, C., and Huber, R., 2006, New insights into the lifestyle of the cold-loving SM1 Euryarchaeon: natural growth as a monospecific biofilm in the subsurface. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 72, p. 192-199.
- Higgins, D. G., Thompson, J. D., and Gibson, T. J., 1994, CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research*, v. 22, p. 4673-4680.

- Hoiczyk, E. T. and Aldridge, P. D., 1998, The junctional pore complex, a prokaryotic organelle, is the molecular motor underlying gliding motility in cyanobacteria. *Current Biology*, v. 8, p. 1161-1168.
- Horn, C., Paulmann, B., Kerlen, G., Junker, N., and Huber, H., 1999, In vivo observation of cell division and anaerobic hyperthermophiles by using a high-intensity dark-field microscope. *Journal of Bacteriology*, v. 181, p. 5114-5118.
- Hutchins, A. M., Holden, J. F., and Adams, M. W. W., 2001, Phosphoenolpyruvate Synthetase from the Hyperthermophilic Archaeon *Pyrococcus furiosus*. *Journal of Bacteriology*, v. 183, p. 709-715.
- Iino, T., 1969, Polarity of flagellar growth in *Salmonella*. *Journal of General Microbiology*, v. 56, p. 227-239.
- Jarrell, K. F. and Koval, S. F., 1989, Ultrastructure and biochemistry of *Methanococcus voltae*. *CRC Critical Reviews in Microbiology*, v. 17, p. 53-87.
- Jarrell, K. F., Bayley, D. P., and Kostyukova, A. S., 1996, The Archaeal Flagellum: a Unique Motility Structure. *Journal of Bacteriology*, v. 178, p. 5057-5064.
- Jarrell, K. F., Bayley, D. P., Correia, J. D., and Thomas, N. A., 2001, Archaeal flagella. *Encyclopedia of life sciences*.
- Jarrell, K. F., Ng, S. Y. M., Chaban, B., 2007, Flagellation and Chemotaxis. *Archaea*. ASM Press.
- Jaschke, M., Butt, H.-J., and Wolff, E. K., 1994, Imaging flagella of *Halobacteria* by atomic force microscopy. *Analyst*, v. 119, p. 1943-1946.
- Johnson, A.-B., Normark, S., and Rhen, M., 2005, Fimbriae, pili, flagella and bacterial virulence. *Concepts in bacterial virulence*. Basel, Schweiz, Karger, p. 89.
- Jones, C. J. and Aizawa, S., 1991, The bacterial flagellum and flagellar motor: structure, assembly and function. *Advances in Microbial Physiology*, v. 32, p. 109-172.
- Kachlany, S. C., Planet, P. J., Bhattacharjee, M. K., Kollia, E., DeSalle, R., Fine, D. H., and Figurski, D. H., 2000, Nonspecific Adherence by *Actinobacillus actinomycetemcomitans* Requires Genes Widespread in Bacteria and Archaea. *Journal of Bacteriology*, v. 182, p. 6169-6176.
- Kalmokoff, M. L., Jarrell, K. F., and Koval, S. F., 1988, Isolation of Flagella from the Archaeobacterium *Methanococcus voltae* by Phase Separation with Triton X-114. *Journal of Bacteriology*, v. 170, p. 1752-1758.
- Kalmokoff, M. L. and Jarrell, K. F., 1991, Cloning and Sequencing of a Multigene Family Encoding the Flagellins of *Methanococcus voltae*. *Journal of Bacteriology*, v. 173, p. 7113-7125.

- Kalmokoff, M. L., Koval, S. F., and Jarrell, K. F., 1992, Relatedness of the flagellins from methanogens. *Archives of Microbiology*, v. 157, p. 481-487.
- Koch, M. K. and Oesterhelt, D., 2005, MpcT is the transducer for membrane potential changes in *Halobacterium salinarum*. *Molecular Microbiology*, v. 55, p. 1681-1694.
- Koike, H., Yokoyama, K., Kawashima, T., Yamasaki, T., Makino, S.-I., Clowney, L., and Suzuki, M., 2005, GATC Methylation by DAM methylase in archaea: its roles and possible transcription regulation by an FFRP. *Proceedings of Japan Academy*, v. 81, p. 278-290.
- Kokoeva, M. V., Storch, K., Klein, C., and Oesterhelt, D., 2002, A novel mode of sensory transduction in archaea: binding protein-mediated chemotaxis towards osmoprotectants and amino acids. *The EMBO Journal*, v. 21, p. 2312-2322.
- Koval, S. F. and Jarrell, K. F., 1987, Ultrastructure and Biochemistry of the Cell Wall of *Methanococcus voltae*. *Journal of Bacteriology*, v. 169, p. 1298-1306.
- König, H., 1988, Archaeobacterial cell envelopes. *Canadian Journal of Microbiology*, v. 34, p. 395-406.
- Kupper, J., Marwan, W., Typke, D., Grünberg, H., Uwer, U., Gluch, M., and Oesterhelt, D., 1994, The Flagellar Bundle of *Halobacterium salinarum* Is Inserted into a Distinct Polar Cap Structure. *Journal of Bacteriology*, v. 176, p. 5184-5187.
- Kuwabra, T., Minaba, M., Iwayama, Y., Inouye, I., Nakashima, M., Marumo, K., Maruyama, A., Sugai, A., Itoh, T., Ishibashi, J.-I., Urabe, T., and Kamekura, M., 2005, *Thermococcus coalescens* sp. nov., a cell-fusing hyperthermophilic archaeon from Suiyo seamount. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, v. 55, p. 2507-2514.
- Laemmli, U. K., 1970, Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, v. 227, p. 680-685.
- LaPaglia, C. and Hartzell, P. L., 1997, Stress-induced production of biofilm in the hyperthermophile *Archaeoglobus fulgidus*. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 63, p. 3158-3163.
- Larsen, S. H., Reader, R. W., Kort, E. N., Tso, W.-W., and Adler, J., 1974, Change in direction of flagellar rotation is the basis of the chemotactic response in *Escherichia coli*. *Nature (London)*, v. 249, p. 74-77.
- Lämmli, U. K., 1970, Cleavage of structural proteins during assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, v. 227, p. 680-685.
- Lechner, J. and Wieland, F., 1989, Structure and biosynthesis of prokaryotic glycoproteins. *Annual Reviews in Biochemistry*, v. 58, p. 173-194.
- Leisner, M., 2004, Archaeelle Zellanhänge: Ultrastruktur-Darstellung-Fluoreszenz-Motilität. .
- Li, C., Motaleb, A., Sal, M., Goldstein, S. F., and Charon, N. W., 2000, Spirochete periplasmic flagella and motility. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology*, v. 2, p. 345-354.

- Li, C., Corum, L., Morgan, D., Rosey, E. L., Stanton, T. B., and Charon, N. W., 2000, The spirochete FlaA periplasmic flagellar sheath protein impacts flagellar helicity. *Journal of Bacteriology*, v. **182**, p. 6698-6706.
- Macnab, R. M., 1999, The Bacterial Flagellum: Reversible Rotary Propellor and Type III Export Apparatus. *Journal of Bacteriology*, v. **181**, p. 7149-7153.
- Macnab, R. M., 2004, Type III flagellar protein export and flagellar assembly. *Biochimica et Biophysica Acta*, v. **169**, p. 207-217.
- Maeder, D. L., Weiss, R. B., Dunn, D. M., Cherry, J. L., Gonzalez, J. M., DiRuggiero, J., and Robb, F. T., 1999, Divergence of the hyperthermophilic archaea *Pyrococcus furiosus* and *P. horikoshii* inferred from complete genomic sequences. *Genetics*, v. **152**, p. 1299-1305.
- Maniatis, T., Fritsch, E. F., and Sambrook, J., 1989, *Molecular cloning: a laboratory manual*. New York, Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Marsin, S. and Forterre, P., 1998, A rolling circle replication initiator protein with a nucleotidyl-transferase activity encoded by the plasmid pGT5 from the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus abyssi*. *Molecular Microbiology*, v. **27**, p. 1183-1192.
- Marwan, W., Alam, M., and Oesterhelt, D., 1991, Rotation and switching of the flagellar motor assembly in *Halobacterium halobium*. *Journal of Bacteriology*, v. **173**, p. 1971-1977.
- Marwan, W. and Oesterhelt, D., 2000, Archaeal Vision and Bacterial Smelling. *ASM News*, v. **66**, p. 83-89.
- Mattick, J. S. and Alm, R. A., 1995, Common architecture of type 4 fimbriae and complexes involved in macromolecular traffic. *Trends in Microbiology*, v. **3**, p. 411-413.
- Mattick, J. S., 2002, Type IV Pili and Twitching Motility. *Annual Reviews in Microbiology*, v. **56**, p. 289-314.
- McBride, M. J., 2001, Bacterial gliding motility: multiple mechanisms for cell movement over surfaces. *Annual Reviews in Microbiology*, v. **55**, p. 49-75.
- Metlina, A. L., 2004, Bacterial and Archaeal Flagella as Prokaryotic Motility Organelles. *Biochemistry (Moscow)*, v. **69**, p. 1203-1212.
- Mevarech, M. and Werczberger, R., 1985, Genetic transfer in *Halobacterium volcanii*. *Journal of Bacteriology*, v. **162**, p. 461-462.
- Miller, J. H., 1972, *Experiments in molecular genetics*. New York, Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Mimori-Kiyosue, Y., Yamashita, I., Fujiyoshi, Y., Yamaguchi, S., and Namba, K., 1998, Role of the outermost subdomain of *Salmonella flagellin* in the filament structure revealed by electron cryomicroscopy. *Journal of Molecular Biology*, v. **284**, p. 521-530.

- Mimori, Y., Yamashita, I., Murata, K., Fujiyoshi, Y., Yonekura, K., Toyoshima, C., and Namba, K., 1995, The structure of the R-type flagellar filament of *Salmonella* at 9 Å resolution by electron cryomicroscopy. *Journal of Molecular Biology*, v. **249**, p. 69-87.
- Moissl, C., Rudolph, C., and Huber, R., 2002, Natural communities of novel archaea and bacteria with a string-of-pearls-like morphology: molecular analysis of the bacterial partners. *Applied and Environmental Microbiology*, v. **68**, p. 933-937.
- Moissl, C., Rudolph, C., Rachel, R., Koch, M., and Huber, R., 2003, In situ growth of the novel SM1 euryarchaeon from a string-of-pearls-like microbial community in its biotope, its physical separation and insights into its structure and physiology. *Archives of Microbiology*, v. **180**, p. 211-217.
- Morand, P. C., Bille, E., Morelle, S., Eugène, E., Beretti, J.-L., Wolfgang, M., Meyer, T. F., Koomey, M., and Nassif, X., 2004, Type IV pilus retraction in pathogenic *Neisseria* is regulated by PilC proteins. *The EMBO Journal*, v. **23**, p. 2009-2017.
- Morgan, D. G., Owen, G., Melanson, L. A., and DeRossier, D. J., 1995, Structure of bacterial flagellar filaments at 11 Å resolution: packing of the α -helices. *Journal of Molecular Biology*, v. **249**, p. 88-110.
- Motaleb, A., Corum, L., Bono, L., Elias, A., Rosa, P., Samuels, D., and Charon, N. W., 2000, *Borrelia burgdorferi* periplasmic flagella have both skeletal and motility functions. *Proceedings of the National Academy of Science USA*, v. **97**, p. 10899-10904.
- Mukhopadhyay, B., Johnson, E. F., and Wolfe, R. S., 2000, A novel control pH₂ on the expression of flagella in the hyperthermophilic strictly hydrogenotrophic methanoarchaeon *Methanococcus janaschii*. *PNAS*, v. **97**, p. 11522-11527.
- 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. *Journal of Bacteriology*, v. **188**, p. 6915-6923
- Nagahisa, K., Ezaki, S., Fujiwara, S., Imanaka, T., and Takagi, M., 1999, Sequence and transcriptional studies of five clustered flagellin genes from hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus kodakaraensis* KOD1. *FEMS Microbiology Letters*, v. **178**, p. 183-190.
- Neuhoff, V., Arold, N., Taube, D., and Erhardt, W., 1988, Improved staining of proteins in polyacrylamide gels including isoelectric focusing gels with clear background at nanogram sensitivity using Coomassie Brilliant Blue G-250 and R-250. *Electrophoresis*, v. **9**, p. 255-262.
- Ng, S. Y. M., Chaban, B., and Jarrell, K. F., 2006, Archaeal Flagella, Bacterial Flagella and Type IV Pili: A Comparison of Genes and Posttranslational Modifications. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology*, v. **11**, p. 167-191.

- Ng, W. V., Kennedy, S. P., Mahairas, G. G., Berquist, B., Pan, M., Shukla, H. D., Lasky, S. R., Baliga, N. S., Thorson, V., Sbrogna, J., Swartzell, S., Weir, D., Hall, J., Dahl, T. A., Welti, R., Goo, Y. A., Leithauser, B., Keller, K., Cruz, R., Danson, M. J., Hough, D. W., Maddocks, D. G., Jablonski, P. E., Krebs, M. P., Angevine, C. M., Dale, H., Isenbarger, T. A., Peck, R. F., Pohlschröder, M., Spudich, J. M., Jung, K. W., Alam, M., Freitas, M., Hou, S., Daniels, C. J., Dennis, P. P., Omar, A. D., Ebhardt, H., Lowe, T. M., Liang, P., Riley, M., Hood, L., and DasSarma, S., 2000, Genomic sequence of *Halobacterium* species NRC-1. Proceedings of the National Academy of Science USA, v. **97**, p. 12176-12181.
- Nicolaus, B., Manca, M. C., Romano, I., and Lama, L., 1993, Production of an exopolysaccharide from two thermophilic archaea belonging to the genus *Sulfolobus*. FEMS Microbiology Letters, v. **109**, p. 203-206.
- Nielsen, H., Engelbrecht, J., Brunak, S., and von Heinje, G., 1997, Identification of prokaryotic and eukaryotic signal peptides and prediction of their cleavage sites. Protein Engineering, v. **10**, p. 1-6.
- Notredame, C., Higgins, D., and Heringa, J., 2000, T-COFFEE: a novel method for multiple sequence alignments. Journal of Molecular Biology, v. **302**, p. 205-217.
- Nutsch, T., Marwan, W., Oetserhelt, D., and Gilles, E. D., 2003, Signal Processing and Flagellar Motor Switching During Phototaxis of *Halobacterium salinarum*. Genome Research, v. **13**, p. 2406-2412.
- Parge, H. E., Forest, K. T., Hickey, M. J., Christensen, D. A., Getzoff, E. D., and Tainer, J. A., 1995, Structure of the fibre-forming protein pilin at 2.6 Å resolution. Nature, v. **378**, p. 32-38.
- Patenge, N., Berendes, A., Engelhardt, H., Schuster, S. C., and Oesterhelt, D., 2001, The *fla* gene cluster is involved in the biogenesis of flagella in *Halobacterium salinarum*. Molecular Microbiology, v. **41**, p. 653-663.
- Peabody, C. R., Chung, Y. J., Yen, M., Vidal-Ingigliardi, D., Pugsley, A. P., and Saier, M. H. Jr., 2003, Type II protein secretion and its relationship to bacterial type IV pili and archaeal flagella. Microbiology, v. **149**, p. 3051-3072.
- Polosina, Y. Y., Jarrell, K. F., Fedorov, O. V., and Kostyukova, A. S., 1998, Nucleoside diphosphate kinase from haloalkalophilic archaeon *Natronobacterium magadii*: purification and characterization. Extremophiles, v. **2**, p. 333-338.
- Poole, F. L. I., Gerwe, B. A., Hopkins, R. C., Schut, G. J., Weinberg, M. V., Jenney, F. E. Jr., and Adams, M. W. W., 2005, Defining genes in the genome of the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus furiosus*: implications for all microbial genomes. Journal of Bacteriology, v. **187**, p. 7325-7332.
- Pyatibratov, M. G., Leonard, K., Tarsov, V. Y., and Fedorov, O. V., 2002, Two immunologically distinct types of protofilaments can be identified in *Natrialba magadii* flagella. FEMS Microbiology Letters, v. **212**, p. 23-27.

- Rachel, R., Wyszckony, I., Riehl, S., and Huber, H., 2002, The ultrastructure of *Ignicoccus*: evidence for a novel outer membrane and for intracellular vesicle budding in an archaeon. *Archaea*, v. 1, p. 9-18.
- Rice, P., Longden, I., and Bleasby, A., 2000, EMBOSS: The European Molecular Open Software Suite. *Trends in Genetics*, v. 16, p. 276-277.
- Rieger, G., Rachel, R., Herrmann, R., and Stetter, K. O., 1995, Ultrastructure of the hyperthermophilic archaeon *Pyrodictum abyssi*. *Journal of Structural Biology*, v. 115, p. 78-87.
- Rieger, G., 1998, Elektronenmikroskopische und biochemische Untersuchungen zum Aufbau des Netzwerkes bei *Pyrodictum*.
- Ring, G. and Eichler, J., 2004, Extreme Secretion: Protein Translocation Across the Archaeal Plasma Membrane. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*, v. 36, p. 35-45.
- Rinker, K. D. and Kelly, R. M., 1996, Growth Physiology of the Hyperthermophilic Archaeon *Thermococcus litoralis*: Development of a Sulfur-Free Defined Medium, Characterization of an Exopolysaccharide, and Evidence of Biofilm Formation. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 62, p. 4478-4485.
- Robb, F. T., Maeder, D. L., Brown, J. R., DiRuggiero, J., Stump, M. D., Yeh, R. K., Weiss, R. B., and Dunn, D. M., 2001, Genomic sequence of the hyperthermophile *Pyrococcus furiosus*: implications for physiology and enzymology. *Methods in Enzymology*, v. 330, p. 134-157.
- Robinson, K. A. and Schreier, H. J., 1994, Isolation, sequence and characterization of the maltose-regulated *mlrA* gene from the hyperthermophilic archaeum *Pyrococcus furiosus*. *Gene*, v. 151, p. 173-176.
- Rosenshine, I., Tchelet, R., and Mevarech, M., 1989, The mechanism of DNA transfer in the mating system of an archaebacterium. *Science*, v. 245, p. 1387-1389.
- Rost, B., Yachdav, G., and Liu, J., 2004, The PredictProtein Server. *Nucleic Acids Research (Web Server issue)*, v. 32, p. W321-W326.
- Rozen, S. and Skaletsky, H. J., 2000, Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. Totowa, NJ, Humana Press, p. 365-386.
- Rudolph, C., Wanner, G., and Huber, R., 2001, Natural community of novel archaea and bacteria growing in cold sulfurous springs with a string-of-pearls-like morphology. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 67, p. 2336-2344.
- Rudolph, J. and Oesterhelt, D., 1996, Deletion Analysis of the *che* Operon in the Archaeon *Halobacterium salinarium*. *Journal of Molecular Biology*, v. 258, p. 548-554.
- Saiki, R. K., Scharf, S. J., Faloona, S. J., Mullis, K. B., Horn, G. T., Erlich, H. A., and Arnheim, N., 1985, Enzymatic amplification of β -globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science*, v. 230, p. 1350-1354.

- Saxton, W. O., 1996, Distortion compensation, selective averaging, 3-D reconstruction, and transfer function correction in a highly programmable system. *Journal of Structural Biology*, v. 116, p. 230-236.
- Schaegger, H. and von Jagow, G., 1987, Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Analytical Biochemistry*, v. 166, p. 368-379.
- Scharf, B., 2002, Real-time imaging of fluorescent flagellar filaments of *Rhizobium lupini* H13-3: flagellar rotation and pH-independent polymorphic transitions. *Journal of Bacteriology*, v. 184, p. 5979-5986.
- Schmitt, R., 2003, Helix rotation model of the flagellar rotary motor. *Biophysical Journal*, v. 85, p. 843-852.
- Schopf, S., 2006, Interaktionen von *Pyrococcus furiosus* mit biotischen und abiotischen Oberflächen.
- Schut, G. J., Zhou, J., and Adams, M. W. W., 2001, DNA Microarray Analysis of the Hyperthermophilic Archaeon *Pyrococcus furiosus*: Evidence for a New Type of Sulfur-Reducing Enzyme Complex. *Journal of Bacteriology*, v. 183, p. 7027-7036.
- Schut, G. J., Brehm, S. D., Datta, S., and Adams, M. W. W., 2003, Whole-Genome DNA Microarray Analysis of a Hyperthermophile and an Archaeon: *Pyrococcus furiosus* Grown on Carbohydrates or Peptides. *Journal of Bacteriology*, v. 185, p. 3935-3947.
- Serganova, I. S., Polosina, Y. Y., Kostyukova, A. S., Metlina, M. G., Pyatibratov, M. G., and Fedorov, O. V., 1995, Flagella of halophilic archaea: biochemical and genetic analysis. *Biochemistry (Moscow)*, v. 60, p. 953 – 957.
- Silverman, M. and Simon, M., 1974, Flagellar rotation and the mechanism of bacterial motility. *Nature (London)*, v. 249, p. 73-74.
- Soto, G. E. and Hultgren, S. J., 1999, Bacterial adhesins: common themes and variations in architecture and assembly. *Journal of Bacteriology*, v. 181, p. 1059-1071.
- Southam, G., Kamokoff, M. L., Jarrell, K. F., Koval, S. F., and Beveridge, T. J., 1990, Isolation, Characterization, and Cellular Insertion of the Flagella from Two Strains of the Archaeobacterium *Methanospirillum hungatei*. *Journal of Bacteriology*, v. 172, p. 3221-3228.
- Speranskii, V. V., Metlina, A. L., Novikova, T. M., and Bakeyeva, L. Y., 1996, Disk-like lamellar structure as part of the archaeal flagellar apparatus. *Biophysics*, v. 41, p. 167-173.
- Stetter, K. O., König, H., and Stackebrandt, E., 1983, *Pyrodoctium* gen. nov., a new genus of submarine disc-shaped sulphur reducing archaeobacteria growing optimally at 105°C. *Systematic and Applied Microbiology*, v. 4, p. 535-551.
- Stone, K., LoPresti, M., Crawford, M., DeAnglis, R., and Williams, K., 1989, Enzymatic digestion of proteins and HPLC peptid isolation. In: A practical guide to protein and peptide purification for microsequencing. Ed.: P.Matsudaira. Academic Press Inc.

- Saiki, R. K., Gelfand, D. H., Stoffel, S., Scharf, S. J., Higuchi, R., Horn, G. T., Mullis, K. B., and Erlich, H. A., 1988, Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science*, v. **239**, p. 487-491.
- Sakuraba, H., Utsumi, E., Schreier, H. J., and Ohshima, T., 2001, Transcriptional Regulation of Phosphoenolpyruvate Synthase by Maltose in the Hyperthermophilic Archaeon, *Pyrococcus furiosus*. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, v. **92**, p. 108-113.
- Samatey, F. A., Imada, K., Nagashima, S., Vonderviszt, F., Kumasaka, T., Yamamoto, M., and Namba, K., 2001, Structure of the bacterial flagellar protofilament and implications for a switch for supercoiling. *Nature*, v. **410**, p. 331-337.
- Strom, M. S. and Lory, S., 1991, Amino Acid Substitutions in Pilin of *Pseudomonas aeruginosa*. *The Journal of Biological Chemistry*, v. **266**, p. 1656-1664.
- Sumper, M., 1987, Halobacterial glycoprotein biosynthesis. *Biochimica et Biophysica Acta*, v. **906**, p. 69-79.
- Sutherland, I. W., 2001, Biofilm exopolysaccharides: a strong and sticky framework. *Microbiology*, v. **147**, p. 3-9.
- Szurmant, H. and Ordal, G. W., 2004, Diversity in Chemotaxis Mechanisms among the Bacteria and Archaea. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, v. **68**, p. 301-319.
- Tarasov, V. Y., Pyatibratov, M. G., Lang, S.-L., Dyll-Smith, M., and Fedorov, O. V., 2000, Role of flagellins from A and B loci in flagella formation of *Halobacterium salinarum*. *Molecular Microbiology*, v. **35**, p. 69-78.
- Thomas, N. A., Bardy, S. L., and Jarrell, K. F., 2001a, The archaeal flagellum: a different kind of prokaryotic motility structure. *FEMS Microbiology Reviews*, v. **25**, p. 147-174.
- Thomas, N. A. and Jarrell, K. F., 2001b, Characterization of Flagellum Gene Families of Methanogenic Archaea and Localization of Novel Flagellum Accessory Proteins. *Journal of Bacteriology*, v. **183**, p. 7154-7164.
- Thomas, N. A., Chao, E. D., and Jarrell, K. F., 2001c, Identification of amino acids in the leader peptide of *Methanococcus voltae* preflagellin that are important for posttranslational processing. *Archives of Microbiology*, v. **175**, p. 263-269.
- Trachtenberg, S. and Gilad, R., 2001, A bacterial linear motor: cellular and molecular organization of the contractile cytoskeleton of the helical bacterium *Spiroplasma melliferum* BC3. *Molecular Microbiology*, v. **41**, p. 827-848.
- Trachtenberg, S., Galkin, V. E., and Egelman, E. H., 2005, Refining the Structure of the *Halobacterium salinarum* Flagellar Filament Using the Iterative Helical Real Space Reconstruction Method: Insights into Polymorphism. *Journal of Molecular Biology*, v. **246**, p. 665-676.
- Tran, T. T., Dam, P., Su, Z., Il, F. L. P., Adams, M. W. W., Zhou, G. T., and Xu, Y., 2007, Operon prediction in *Pyrococcus furiosus*. *Nucleic Acids Research*, v. **35**, p. 11-20.

- Turner, L., Ryu, S., and Berg, H. C., 2000, Real-time imaging of fluorescent flagellar filaments. *Journal of Bacteriology*, v. **182**, p. 2793-2801.
- Tusnády, G. E. and Simon, I., 1998, Principles governing amino acid composition of integral membrane proteins: application to topology prediction. *Journal of Molecular Biology*, v. **283**, p. 489-506.
- Tusnády, G. E. and Simon, I., 2001, THE HMMTOP transmembrane topology prediction server. *Bioinformatics*, v. **17**, p. 849-850.
- Typke, D., Nitsch, M., Möhrle, A., Hegerl, R., Alam, M., Grogan, D., and Trent, J., 1998, Structural studies of the flagellar filament of some archaebacteria. *Inst.Phys.Conf.Ser.*, v. **93**, p. 379-380.
- Upreti, R. K., Kumar, M., and Shankar, V., 2003, Bacterial glycoproteins: functions, biosynthesis and applications. *Proteomics*, v. **3**, p. 363-279.
- Vassilenko, K. S., Rachel, R., and Kostyukova, A. S., 1994, Structural studies of *Pyrococcus furiosus* flagella. Abstracts of the International Symposium of Biological Motility, p. **289**.
- Voisin, S., Houliston, R. S., Kelly, J., Brisson, J., Watson, D., Bardy, S. L., Jarrell, K. F., and Logan, S. M., 2005, Identification and Characterization of the Unique *N*-Linked Glycan Common to the Flagellins and S-layer Glycoprotein of *Methanococcus voltae*. *The Journal of Biological Chemistry*, v. **280**, p. 16586-16593.
- Walker, J. E., Kay, C. A., and Paranchych, W., 1982, Distantly related sequences in the alpha- and beta-subunits of ATP synthase, myosin, kinases and other ATP-requiring enzymes and a common nucleotide binding fold. *EMBO Journal*, v. **1**, p. 945-951.
- Wanner, G., Formanek, H., Galli, D., and Wirth, R., 1989, Localization of aggregation substances of *Enterococcus faecalis* after induction by sex pheromones. *Archives of Microbiology*, v. **151**, p. 491-497.
- Ward, D. E., Revet, I. M., Nandakumar, R., Tuttle, J. H., deVos, W. M., van de Ost, J., and DiRuggiero, J., 2002, Characterization of plasmid pRT1 from *Pyrococcus sp.* strain JT1. *Journal of Bacteriology*, v. **184**, p. 2561-2566.
- Weinberg, M. V., Jenney, F. E. Jr., Cui, X., and Adams, M. W. W., 2004, Rubrerythrin from the Hyperthermophile Archaeon *Pyrococcus furiosus* Is a Rubredoxin-Dependent, Iron-Containing Peroxidase. *Journal of Bacteriology*, v. **186**, p. 7888-7895.
- Wieland, F., Paul, G., and Sumper, M., 1985, Halobacterial Flagellins Are Sulfated Glycoproteins. *The Journal of Biological Chemistry*, v. **260**, p. 15180-15185.
- Wimmer, N., 2007, Expression und funktionelle Charakterisierung von Teilbereichen des archaellen Flagellins FlaB2 aus *Pyrococcus furiosus*.
- Wolfgang, M., vanPutten, J. P. M., Hayes, S. F., Dorward, D., and Koomey, M., 2000, Components and dynamics of fiber formation define a ubiquitous biogenesis pathway for bacterial pili. *The EMBO Journal*, v. **19**, p. 6408-6418.

- Wolgemuth, C., Hoiczyk, E. T., Kaiser, D., and Oster, G., 2002, How myxobacteria glide. *Current Biology*, v. 12, p. 369-377.
- Yonekura, K., Maki, S., Morgan, D. G., DeRossier, D. J., Vonderviszt, F., Imada, K., and Namba, K., 2000, The bacterial flagellar cap as the rotary promoter of the bacterial flagellar filament self-assembly. *Science*, v. 290, p. 2148-2152.
- Yonekura, K., Maki-Yonekura, S., and Namba, K., 2003, Complete anatomic model of the bacterial flagellar filament by electron cryomicroscopy. *Nature*, v. 424, p. 643-650.
- Zacharius, R. M., Zell, T., Morrison, J. H., and Woodlock, J. J., 1969, Glycoprotein staining following electrophoresis on acrylamide gels. *Analytical Biochemistry*, v. 30, p. 148-152.
- Zillig, W., Holz, I., Klenk, H. P., Trent, J., Wunderl, S., Janekovic, D., Imsel, E., and Haas, B., 1987, *Pyrococcus woesei*, sp. nov., an ultra-thermophilic marine *Archaeobacterium*, representing a novel order, *Thermococcales*. *Systematic and Applied Microbiology*, v. 9, p. 62-70.

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

So eine Arbeit wird ja bekanntlich nie wirklich fertig.... Am Ende dieser Arbeit noch der

Dank an wichtige Menschen, die mir mit Rat und Tat zur Seite standen:

Prof. Dr. Reinhard Wirth, der mir die Möglichkeit gab, mich mit diesem Thema während meiner Doktorarbeit auseinander zu setzen. Er hat es in einzigartiger Weise geschafft, mir Freiheiten zur Verwirklichung meiner Ideen einzuräumen, mich bei Niederschlägen zu ermuntern und die Freude über Erfolge mit uns zu teilen. Vielen Dank für die unermüdliche Diskussions- und Hilfsbereitschaft, die Möglichkeit an diversen Tagungen teilzunehmen, die häufigen Gespräche zwischen Tür und Angel bzw. Telefon und natürlich nicht zu vergessen: die tollen Gartenfeste!!!

Prof. Dr. Michael Thomm, für die Möglichkeit diese Dissertation an seinem Lehrstuhl anfertigen zu können und alle Ratschläge und Diskussionen.

Prof. Dr. Gerhard Wanner, am botanischen Institut der Münchner Universität für all die fleißigen Arbeitsstunden am Rasterelektronenmikroskop und die stete Begeisterung für die kleinen und großen mikrobiologischen Fragestellungen!

Die **Mitarbeiter des Lehrstuhls!** Besonderer Dank für die Aufnahme im Isotopenlabor gilt **Souad Naji, Sebastian Grünberg, Mirjam Zeller, Melanie Surma** und **Annette Keese**, die immer ein Plätzchen für mich frei hatten. Danke an **Elisabeth Nagelfeld**, auch für die Gespräche über "die Weisheit der Rothaarigen"... Ihr alle habt mir immer geholfen, wenn ich Hilfe brauchte! Vielen Dank natürlich auch an alle die hier namentlich nicht genannt wurden!

Das Elektronenmikroskopie-Team - leider verzogen, aber nicht vergessen! Danke an **PD Dr. Reinhard Rachel** für die nützlichen Tipps und die Möglichkeit das EM trotz Umzug an den Lehrstuhl von **Prof. Dr. Ralph Witzgall** weiterhin nutzen zu können. Danke an die "Ex-Kellerkinder" **Tillmann Burghardt, Sonja Gürster, Caro Meyer, Andreas "Flash" Klingl, Thomas Menzl, Benny Junglas** und **Manfred Saller** für die Unterstützung, die tollen Gespräche und Feste!

Die **Kellerkinder der AG Wirth!** Ich hätte es nie geglaubt, aber es funktioniert phantastisch wenn viele Frauen zusammen arbeiten! Danke an **Elke Samberger**, die mir in den gesamten, knapp vier Jahren meiner Dissertation zur Seite stand! Vielen Dank an **Gabi Kunz**, für die lustige Zeit im Labor und die Schweizer Schoki. **Christine Thoma**, für deine Freundschaft, die wissenschaftlichen Diskussionen, Gespräche über Männer und eiskalte Schokolade die auch in München lecker ist! Danke an **Simone Schopf**, du bist mir in den Jahren eine sehr gute Freundin geworden! Vielen Dank für die wissenschaftlichen Gespräche bei Speis und Trank, über Männer (natürlich...) und diversen "Kleinkram". Danke an **Michaela Stieglmeier** für die Freundschaft, gemeinsame Begeisterung fürs Klettern und die vielen Gespräche. **Christine Moissl**, danke für alles! Das Aufführen würde Seiten füllen! Danke an die Mädls, die sich neben der harten Arbeit im Labor auch für (meine) "Sport-Spinnerei" begeisterten: **Claudia Held, Andrea Kopp, Katrin Dietl, Annett Bellack** und **Monika Frank**. Danke auch an **Madeleine Leisner, Daniel Müller, Nadin Wimmer, Fabian Bröckelt** und alle die ich jetzt vermutlich vergessen habe.

Die Kellerkinder der **Fermentation!** Danke an die starken Kerle im Keller, **Thomas Hader** und **Konrad Eichinger**, für die Unterstützung bei der Fermentation und der Hilfe bei allen anderen Fragen und Schwierigkeiten und Problemchen.

Meinen **Freunden**, die sich aller meiner Probleme, egal ob als Voll- oder Nicht-Wissenschaftler annahmen! Danke an meine Familie!

Meine Eltern **Heidemarie** und **Max Näther**, ohne deren Unterstützung ich heute nicht hier wäre! Danke an meine Geschwister **Caroline** (Nini, the Carotto) und **Markus** für alle Gespräche, die gemeinsamen Spieleabende, mal wieder bei (veganer) Speis und Trank und einfach dafür, dass wir Geschwister sind!

Danke an **Nils!** Für den Glauben an mich, mindestens eine Trilliarde Telefonminuten, deine Freundschaft und deine Unterstützung, auch in den allerschlimmsten Zeiten und deine Liebe!